



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12Q 1/02, C12N 15/12, 5/10 C12Q 1/66		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/11257 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Juni 1993 (10.06.93)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02718 (22) Internationales Anmeldedatum: 25. November 1992 (25.11.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 38 621.3 25. November 1991 (25.11.91) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-6507 Ingelheim am Rhein (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : CZERNILOFSKY, Armin, Peter [AT/AT]; Schießgraben 11/4/38, A-2500 Baden (AT). HIMMLER, Adolf [AT/AT]; Fürst Liechtensteinstr. 2/3, A-1236 Wien (AT). STRATOWA, Christian [AT/AT]; Schellinggasse 3/9, A-1010 Wien (AT). WEYER, Ulrike [DE/AT]; Schottenfeldgasse 92/2/20, A-1070 Wien (AT). LAMCHE, Herbert [AT/AT]; Friedhofsg. 453, A-2534 Alland (AT). SCHÄFER, Renate [DE/AT]; Penzingerstraße 30/4, A-1140 Wien (AT).		(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH; Postfach 200, D-6507 Ingelheim am Rhein (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: PROCESS FOR SCREENING SUBSTANCES CAPABLE OF MODULATING A RECEPTOR-DEPENDENT CELLULAR SIGNAL TRANSMISSION PATH (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SCREENEN VON SUBSTANZEN MIT MODULIERENDER WIRKUNG AUF EINEN REZEPTORABHÄNGIGEN ZELLULÄREN SIGNALÜBERTRAGUNGSWEG (57) Abstract <p>A process is disclosed for screening substances having a modulating effect on a receptor-dependent signal transmission path in mammal cells. Test cells are used transformed with a reporter gene and with a regulatory sequence functionally linked thereto sensitive to the IP₃/DAG concentration, as well as with a coding DNA for a receptor coupled to the phospholipase effector system, in particular a G protein-coupled receptor. The use of reference cells without receptor ADN and reference cells with specificity for the adenylate cyclase effector system allows substances to be identified having potential pharmacological action and specificity for a determined receptor-dependent signal transmission path.</p> (57) Zusammenfassung <p>Verfahren zum Screenen von Substanzen mit modulierender Wirkung auf einen rezeptorabhängigen Signalübertragungsweg in Säugetierzellen. Es werden Testzellen eingesetzt, die transformiert sind mit einem Reportergen und einer damit funktionell verbundenen regulatorischen Sequenz, die auf die IP₃/DAG-Konzentration anspricht, sowie mit einer DNA, kodierend für einen an das Phospholipase-Effektorsystem gekoppelten Rezeptor, insbesondere einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Die Verwendung von Kontrollzellen ohne Rezeptor-DNA sowie von Kontrollzellen mit Spezifität für das Adenylatzyklase-Effektorsystem erlaubt die Identifizierung von Substanzen mit potentieller pharmakologischer Wirkung, die Spezifität für einen bestimmten rezeptorabhängigen Signalübertragungsweg aufweisen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PT	Portugal
BR	Brasilien	IE	Irland	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zum Screenen von Substanzen mit modulierender Wirkung auf einen rezeptorabhängigen zellulären Signalübertragungsweg

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Bestimmung der modulierenden Wirkung von Substanzen auf einen rezeptorabhängigen Signalübertragungsweg in menschlichen oder tierischen Zellen.

Herkömmliche Tests zum Auffinden pharmakologisch wirksamer Substanzen sind häufig Assays, in denen eine Substanz daraufhin untersucht wird, inwieweit sie einen an einen Rezeptor gebundenen (markierten) Liganden verdrängen kann (Radioligandentests). Mit solchen Tests können nur solche Substanzen identifiziert werden, die die Bindung von bekannten Liganden Rezeptor-Bindungsstellen beeinflussen. Diese Tests erfassen somit nur die Bindung der Substanz, nicht eine funktionelle Antwort der Zelle und können daher nicht unterscheiden, ob die bindende Substanz agonistische oder antagonistische Wirkung hat. Für Radioligandentests werden relativ große Mengen an Rezeptoren benötigt und häufig rezeptorhältige Membranfraktionen verwendet, die aus tierischem Gewebe isoliert werden. Diese Gewebe können aus mehreren Zellarten bestehen, die verschiedene oder auch heterologe Rezeptoren enthalten. Trotz der großen Bedeutung solcher Substrate kann die heterologe Zusammensetzung bzw.- im Falle der Untersuchung von Drogen auf ihre pharmakologische Wirkung im Menschen - der Spezies-Unterschied Tier-Mensch und der sich daraus ergebende Unterschied in den Bindungseigenschaften von Liganden an den menschlichen Rezeptor und an tierische Rezeptoren Probleme bei der Interpretation der

Ergebnisse hervorrufen.

Viele Transmembran-Signalübertragungssysteme bestehen aus den folgenden Membran-gebundenen Komponenten:
a) einem Zelloberflächenrezeptor; b) einem Guanin-Nukleotid-bindenden und GTP spaltenden regulatorischen Protein, das als G-Protein bezeichnet wird und das sowohl an den Rezeptor als auch an seinen Effektor gekoppelt werden kann; c) einem sog. "Effektor", z.B. einem Ionenkanal oder Adenylatzyklasen, Guanylatzyklasen oder Phospholipasen.

Die sog. G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermitteln die Wirkungen von sehr unterschiedlichen extrazellulären Signalen, wie Licht, Duftstoffen, (Peptid)hormonen, Neurotransmittern, etc.; sie wurden in evolutionär so weit auseinanderliegenden Organismen, wie es Mensch und Hefe sind, identifiziert (Dohlman et al., 1991). Beinahe alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren weisen untereinander Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz auf; es wird angenommen, daß allen gemeinsam ein ähnliches topologisches Motiv zugrundeliegt, das aus sieben hydrophoben (möglicherweise α -helikalen) Abschnitten besteht, die die Lipiddoppelschicht durchdringen.

Zelloberflächenrezeptoren erkennen die passenden Liganden aus einer Vielzahl von extrazellulären Stimuli. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor wird eine Signalkaskade aktiviert, die mit der Aktivierung des heterotrimären G-Proteins beginnt, die Aktivierung des Rezeptors über einen längeren Zeitraum führt bei bestimmten Rezeptoren zur Desensibilisierung, die durch verschiedenartige Modifikationen des Rezeptors hervorgerufen wird. Die Wechselwirkung des G-Proteins mit dem aktivierten Rezeptor bewirkt den

Austausch

von Guanosindiphosphat (GDP), gebunden an die α -Untereinheit, durch Guanosintriphosphat (GTP), Dissoziation des α -GTP-Komplexes vom β - γ -Heterodimer und Hydrolyse von GTP zu GDP. Ein einziger Rezeptor kann zahlreiche G-Proteinmoleküle aktivieren, wodurch das Liganden-Bindungsereignis verstärkt wird. Die α -Untereinheit, an die GTP gebunden ist, und die freie β - γ -Untereinheit können mit den Effektoren in Wechselwirkung treten, wodurch das Signal noch weiter verstärkt wird, indem sog. "second messengers" gebildet werden. Niedermolekulare Second Messengers, wie cAMP (zyklisches AMP), ausgelöst durch Aktivierung der Adenylatzyklase, cGMP (zyklisches GMP), ausgelöst durch Aktivierung der Guanylatzyklase, oder Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerine (DAG), ausgelöst durch Aktivierung von Phospholipasen, wie Phospholipase C oder, unter Beteiligung von Hydrolasen, Phospholipase D (Billah et al., 1989), bewirken ihrerseits intrazelluläre Veränderungen. Dazu zählen die selektive Phosphorylierung von Proteinen durch Aktivierung von Proteinkinasen (z.B. PKC durch IP₃/DAG, PKA durch cAMP), die Beeinflussung der Regulation der Transkription bestimmter Gene, die Reorganisation des Zytoskeletts und die Depolarisierung der Membran. (Eine antagonistisch wirksame Substanz kann die durch eine agonistisch wirksame Substanz hervorgerufene Wechselwirkung und die dadurch bewirkte Konzentrationsänderung des Second Messengers ganz oder teilweise aufheben bzw. selbst zu einem reversen funktionellen Effekt führen.) Über dieses Signalübertragungssystem können Zellen miteinander kommunizieren und ihre Entwicklung bzw. die durch sie ausgelösten Wirkungen koordinieren. Die nicht-aktivierte Form des G-Proteins wird wiederhergestellt, wenn das an die α -Untereinheit des G-Proteins gebundene

GTP zu GDP hydrolysiert wird.

Die spezifischen, mit der Aktivierung von Phospholipasen, deren Reaktionsprodukt ein DAG ist, bzw. der Adenylatzyklase assoziierten Signalübertragungswege werden im folgenden als "Phospholipase-Signalübertragungsweg" (oder "Phospholipase-Effektorsystem"), bzw. "Adenylatzyklase-Signalübertragungsweg" (oder "Adenylatzyklase-Effektorsystem") bezeichnet.

In Säugetieren wurden bis jetzt ca. hundert verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gefunden (einige davon binden denselben Liganden). Beispielsweise wurden bisher fünf verschiedene muskarinische Rezeptor-Subtypen, mehr als acht verschiedene adrenergische Rezeptoren, mindestens fünf verschiedene Serotoninrezeptoren und vier verschiedene Opsinrezeptoren identifiziert. Eine wachsende Gruppe von Rezeptoren und Rezeptor-Subtypen, die auf Purine, Bombesin, Bradykinin, Thrombin, Histamin, Dopamin, Ecosinoide, Vasopressin, Peptidhormone wie GHRH ("growth hormone releasing hormone") und Somatostatin ansprechen, wurden kloniert und charakterisiert (Dohlman et al., 1991, Simon et al., 1991; TIPS Receptor Nomenclature Supplement, 1991; Doods und von Meel, 1991; Probst et al., 1992). Unterschiedliche Formen, oder Subtypen, von Rezeptoren, die auf denselben Liganden ansprechen, können auch aufgrund der von ihnen ausgelösten intrazellulären Reaktionen voneinander unterschieden werden. Diese spezifischen Rezeptor-Subtypen können mit verschiedenen Effektorsystemen gekoppelt sein und verschiedene Ionenkanäle regeln. Da ein einziger Rezeptor-Subtyp (möglicherweise in derselben Zelle oder in verschiedenen Zellen) an mehr als einen Effektor

gekoppelt sein kann und viele Rezeptor-Subtypen dieselben Effektoren aktivieren können, werden komplizierte Signalübertragungsnetzwerke ausgebildet. Darüberhinaus hat die Charakterisierung der G-Proteine bzw. der Effektoren gezeigt, daß auch sie durch große Genfamilien spezifiziert sind. Es wurden zahlreiche G-Proteine, verschiedene Typen von Adenylatzyklasten und Phospholipasen, wie Phospholipase C und A2, identifiziert. Auch die G-Protein abhängigen Ionenkanäle können in verschiedene Proteinfamilien eingeteilt werden. Welche Kriterien die Spezifität der Wechselwirkung der heterogenen Population der G-Proteine und Effektorproteine bestimmen, auf welche Weise spezifische Rezeptoren mit einer bestimmten G-Protein-Variante verbunden sind, wie sie autonome Kreisläufe bilden, auf welche Weise diese Signalkreisläufe miteinander interagieren und wie sie während der Zelldifferenzierung von neuem gebildet werden, ist noch nicht geklärt.

Die derart aktivierten Transkriptionsfaktoren (z.B. CREB-Protein, AP1-Protein) treten in Wechselwirkung mit den regulatorischen DNA-Elementen CRE (CRE-Element, "cAMP responsive element") bzw. TRE (TRE = "TPA responsive element"; TPA = Phorbol-12-Myristat-13-Acetat = Phorbolester), die CREB bzw. AP1 binden: viele Gene, deren Transkription durch cAMP reguliert ist (z.B. Ratten-Somatostatin, Human- α -Gonadotropin), enthalten in der 5'-flankierenden Region eine konservierte Sequenz als regulatorisches Element. Diese Sequenz ist identisch oder ähnlich dem palindromischen Octamer TGACGTCA (Montminy et al., 1990). TRE-Elemente enthalten das sehr ähnliche heptamere Motiv TGAGTCA, das sich von der CRE-Element-Konsensussequenz nur durch ein einziges Nukleotid unterscheidet (Deutsch et al., 1988). Das

TRE-Motiv, oder sehr ähnliche Motive, wurde in vielen Genen identifiziert, deren Transkription durch Phorbol-ester aktiviert wird (Angel et al., 1987a und b; Lee et al., 1987). Umgebende DNA-Sequenzen bzw. Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Faktoren bestimmen u.a. die konkreten Regulationsphänomene an einem bestimmten Gen.

Bedingt durch die Komplexität des Netzwerkes der Signalübertragungswege kann es zu sog. "crosstalk" zwischen Signalübertragungswegen, z.B. dem Adenylatzyklase- und dem Phospholipase C-Signalübertragungsweg, kommen. Unter "crosstalk" wird das Phänomen verstanden, daß die Beeinflussung des einen Effektorsystems auch zur Beeinflussung des anderen führt (Sassone-Corsi et al., 1990; Houslay, 1991). Das Phänomen des Crosstalk wird physiologisch zur Signalintegration bzw. Signalvernetzung verwendet, um eine Redundanz der Signale herzustellen bzw. die Kommunikation der verschiedenen Signalübertragungswege zu gewährleisten. Crosstalk kann auf verschiedenen Ebenen des Signalübertragungsweges stattfinden, u.a. auf Ebene der G-Proteine. Beispielsweise kann ein Rezeptor bzw. Rezeptorsubtyp mit mehr als einer G-Protein-Variante wechselwirken, sodaß gegebenenfalls sowohl der cAMP- als auch der IP₃/DAG-Spiegel verändert werden. Eine mögliche Ursache für pathologische Veränderungen der Zelle ist die Störung dieser Wechselwirkungen, z.B. wenn ein bestimmter Rezeptor im physiologischen Sinn nicht korrekt mit einem Effektorsystem wechselwirkt.

Es besteht ein Bedarf an Assays, die es ermöglichen, für die Behandlung von pathologischen Zuständen Drogen zu finden, die spezifisch für einen bestimmten Rezeptor bzw. Rezeptorsubtyp sind und die darüberhinaus

spezifisch nur einen bestimmten rezeptorabhängigen Signalübertragungsweg beeinflussen.

Es wurden bereits Assays entwickelt, die sich den Effekt zunutze machen, daß die modulierende Wirkung von Substanzen auf den rezeptorabhängigen Signalübertragungsweg über die Expression von Genen nachgewiesen werden kann:

Ein von King et al., 1990, beschriebenes Assay-System beruht auf der Beeinflussung des Signalübertragungsweges, der von den G-Protein-gekoppelten Pheromon-Rezeptoren von *Saccharomyces cerevisiae* benutzt wird, wobei in der Hefezelle die Reaktion auf die Bindung einer agonistisch wirksamen Verbindung an einen in die Hefezelle transfizierten Rezeptor kolorimetrisch gemessen wird. Dazu wurde ein modifiziertes β -Adrenorezeptorgen unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren GAL1-Promotors (zwecks Erzielung hoher Expressionsraten) mit der Säugetier-G-Protein-Untereinheit $G_{s\alpha}$ in einem Hefestamm co-transfiziert, der ein Reporterogen (β -Galaktosidase) unter der Kontrolle eines auf Pheromon ansprechenden FUS1-Promotors stabil im Genom integriert enthält. Dieses System bietet die Möglichkeit zum Screenen von Substanzen, deren agonistische Wirkung β -Galaktosidase aktiviert, wobei diese Aktivierung in einem einfachen, auf Farbumschlag basierenden, automatisierbaren Assay gemessen werden kann. Dieses System weist jedoch den Nachteil auf, daß die Verwendung eines aus seinem komplexen System isolierten Humanproteins in einer Hefezelle einen direkten Rückschluß auf die Vorgänge in der humanen Zelle nicht ohne weiteres zuläßt. Außerdem erfordert dieses System in Hefezellen die Co-Transfektion einer geeigneten G-Protein-Untereinheit, die mit dem humanen Rezeptor in Wechselwirkung treten

kann. Dieses System verwendet nicht das den höheren Zellen eigene Signaltransduktionssystem, die funktionelle Analyse von rezeptorwirksamen Substanzen in diesem System ist daher problematisch.

Von Montmayeur und Borelli, 1991, wurde ein Assay beschrieben, der auf der Beeinflussung des Adenylatzyklase-Signalübertragungsweges durch Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (es wurden D₂-Rezeptoren und der β -adrenergische Rezeptor verwendet) beruht. Dabei werden mit den Rezeptoren Humanzellen transformiert, die als Reportergen das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (CAT) unter der Kontrolle eines Thymidin-Kinase(TK)-Promotors enthalten. Dem Promotor ist eine synthetische Oligodesoxynukleotidsequenz vorgeschaltet, die ein auf cAMP ansprechendes Promotorelement ("cAMP responsive element" CRE) enthält. Anhand der CAT-Aktivität konnte gezeigt werden, daß agonistisch wirksame Verbindungen für den β -adrenergischen Rezeptor, von dem bekannt ist, daß er Adenylatzyklase aktiviert, eine dosisabhängige Steigerung der CAT-Aktivität bewirkten. Nach Co-Transfektion mit den Dopaminrezeptoren, die Adenylatzyklase inhibieren, sank diese Aktivität wieder. Dies zeigte, daß die durch cAMP induzierte Expression des Reportergens dosisabhängig positiv und negativ moduliert werden kann.

Dieser Assay ist auf die Messung der Expression von Genen beschränkt, die durch die cAMP-Konzentration reguliert wird; er erlaubt nicht die Messung der IP₃/DAG-regulierten Genexpression. Auch Wechselwirkungen zwischen Adenylatzyklase- und Phospholipase-Signalübertragungsweg infolge von Crosstalk können mit diesem Assay nicht bzw. nur partiell erfaßt werden.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, das zum Screenen von Substanzen geeignet ist, die rezeptorabhängig einen Phospholipase-Signalübertragungsweg, insbesondere den Phospholipase C-Signalübertragungsweg modulieren. Dazu zählen Substanzen, die an die Liganden-Bindungsstelle des Rezeptors binden, allosterisch wirkende Substanzen sowie Substanzen, die in bezug auf die Liganden-Bindungsstelle nicht-kompetitiv wirken. Insbesondere sollte mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren bereitgestellt werden, das automatisierbar und somit zum Screenen von Substanzen in hohen Durchsatzraten geeignet ist und das auch die Untersuchung von komplexen Substanzgemischen, wie Extrakten von Organismen, auf ihren Gehalt an pharmakologisch wirksamen Substanzen erlaubt.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Bestimmung der modulierenden Wirkung einer Substanz auf einen rezeptorabhängigen Signalübertragungsweg in der menschlichen oder tierischen Zelle. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man die modulierende Wirkung der Substanz auf die Aktivität einer Phospholipase oder auf einen im Signalübertragungsweg der Phospholipaseaktivierung vorgeschalteten oder nachgeschalteten Mechanismus, ausgelöst durch einen an den Signalübertragungsweg gekoppelten Rezeptor bestimmt, indem man Säugetierzellen, die

a) transformiert sind mit einer rekombinanten DNA, enthaltend ein Reportergen und eine regulatorische Sequenz, die auf die durch die Modulation der Phospholipase-Aktivität hervorgerufene Konzentrationsänderung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) und eines Diacylglycerins (DAG) anspricht, so daß die Expression des Reportergens durch eine

Konzentrationsänderung von IP₃/DAG moduliert wird, und die weiters

b) transformiert sind mit einer rekombinanten DNA, enthaltend eine für einen Rezeptor, der mit dem Phospholipase-Effektorsystem gekoppelt ist, kodierende Sequenz derart, daß die Zellen den Rezeptor exprimieren,

mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und die Konzentration des Reporterergenproduktes mißt.

Die rekombinante DNA, welche auf Änderung der IP₃/DAG Konzentration - oder im Fall von Kontrollzellen, deren Einsatz im folgenden noch erläutert wird, auf Änderung der cAMP-Konzentration - anspricht, ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Sie wird im folgenden als "Sensor-DNA" bezeichnet. Ein Reporterergen ist dadurch definiert, daß sein Expressionsprodukt detektierbar und quantifizierbar durch Messung eines Signals ist, das seiner Konzentration proportional ist.

In der Sensor-DNA enthaltene regulatorischen Sequenzen, die auf die Konzentrationsänderung von IP₃/DAG ansprechen, enthalten ein oder mehrere heptamere TRE-Motive, im folgenden als "TRE-Element" bezeichnet.

In der Sensor-DNA enthaltene regulatorische Elemente, die auf die Konzentrationsänderung von cAMP ansprechen, enthalten ein oder mehrere oktamere CRE-Motive, im folgenden als "CRE-Elemente" bezeichnet.

Alternativ kann die Sensor-DNA eine Sequenz enthalten, die für ein Protein kodiert, das erst posttranskriptional direkt durch Erhöhung der Kalzium-Konzentration aktiviert wird.

Die rekombinante DNA, die eine für einen Rezeptor kodierende Sequenz enthält, wird im folgenden als

"Rezeptor-DNA" bezeichnet.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Zellen, die nur mit Sensor-DNA transformiert sind. Diese Zellen werden im folgenden als "Prätestzellen" bezeichnet.

Zellen, die mit Sensor-DNA und Rezeptor-DNA transformiert sind, werden im folgenden als "Testzellen" bezeichnet; diese Zellen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Wenn Substanzen im Hinblick auf ihre pharmakologische Wirkung für die Behandlung pathologischer Zustände des Menschen untersucht werden sollen, enthält die Rezeptor-DNA vorzugsweise eine für einen humanen Rezeptor kodierende Sequenz. (Das erfindungsgemäße Verfahren dient bevorzugt zum Auffinden von Substanzen, die für die Behandlung von pathologischen Zuständen des Menschen geeignet sind. Es kann jedoch auch zum Screenen von Substanzen, die für die Behandlung von Tieren zum Einsatz kommen, verwendet werden; in diesem Fall werden die entsprechenden tierischen Rezeptoren verwendet.)

Unter "Substanz" werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung sowohl Reinsubstanzen als auch Substanzgemische verstanden.

Unter "modulierender" Wirkung wird ein agonistischer oder antagonistischer Effekt auf einen rezeptorabhängigen Signalübertragungsweg verstanden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Zellen mit einer für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor kodierenden DNA

transformiert.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zusätzlich Kontrollzellen, die nur mit rekombinanter DNA gemäß Schritt a) transformiert sind (TRE-Prätestzellen), mit der zu untersuchenden Substanz behandelt, um zu überprüfen, ob die Expression des Reportergens auf eine rezeptorabhängige Modulation zurückzuführen ist. Falls die Expression des Reportergens auf eine rezeptorunabhängige bzw. im Fall des Vorhandenseins von endogenen Rezeptoren von diesen Rezeptoren abhängige Modulation des Phospholipase-Effektorsystems zurückzuführen ist, wird diese Modulation mit den TRE-Prätestzellen erfaßt.

Um die Spezifität der zu untersuchenden Substanz auf den Phospholipase-Signalübertragungsweg zu überprüfen, werden zweckmäßig Paralleluntersuchungen mit Prätestzellen durchgeführt, deren Sensor-DNA eine regulatorische Sequenz enthält, die auf die durch die Modulation von Adenylatzyklase hervorgerufene Änderung der cAMP-Konzentration anspricht (CRE-Prätestzellen). Gegebenenfalls werden zusätzlich CRE-Testzellen als Kontrolle verwendet, die mit demselben Rezeptor transformiert sind wie die TRE-Testzellen.

CRE-Testzellen können nicht nur als Kontrollzellen, sondern auch als primäre Substratzellen in einem Screening eingesetzt werden, in dem Substanzen auf ihre rezeptorabhängig modulierende Wirkung auf den Adenylatzyklase-Signalübertragungsweg untersucht werden. In diesem Fall sind die CRE-Testzellen mit Rezeptor-DNA transformiert, die die für einen an das Adenylatzyklase-Effektorsystem gekoppelten Rezeptor kodierende Sequenz enthält. CRE-Prätestzellen werden in

einem solchen Screening als Kontrollzellen eingesetzt. Gegebenenfalls dienen TRE-Prätestzellen und gegebenenfalls zusätzlich TRE-Testzellen, transformiert mit dem identischen, an das Adenylatzyklase-Effektorsystem gekoppelten Rezeptor, als weitere Kontrolle.

Zellen, die den interessierenden Rezeptor-Typ nicht endogen exprimieren, sind für die Herstellung von (Prä)Testzellen bevorzugt, weil die endogene Expression des Rezeptors selbst aufgrund der Änderung der Expression des Reportergens ein Signal gibt, das mit dem Meßergebnis interferiert. Die Verwendung von Zellen, die den Rezeptor endogen exprimieren, ist jedoch nicht ausgeschlossen, sofern gewährleistet ist, daß diese Zellen den exogenen Rezeptor stark überexprimieren, sodaß die endogene Expression im Vergleich dazu vernachlässigbar gering ist und das Meßergebnis dadurch nicht beeinträchtigt wird. Um festzustellen, ob sich eine Zelle grundsätzlich als (Prä)testzelle für das erfindungsgemäße Verfahren eignet, z.B. daß sie den speziellen Rezeptor, für den der modulierende Einfluß auf das Phospholipase-Effektorsystem durch die zu untersuchende Substanz bestimmt werden soll, nicht oder nur in geringem Ausmaß exprimiert, kann z.B. so vorgegangen werden, daß eine Säugetierzelle mit TRE-Sensor-DNA transformiert und anschließend mit einer Substanz behandelt wird, von der bekannt ist, daß sie den fraglichen Rezeptor aktiviert. Wenn die Zelle auf diese Behandlung nicht oder nur in geringem Ausmaß anspricht, kann sie für die Verwendung als Testzelle als grundsätzlich geeignet angesehen werden. (Für die Überprüfung von Zellen auf ihre Eignung als CRE-Testzellen werden die Zellen analog getestet mit dem Unterschied, daß CRE-Sensor-DNA verwendet wird.) Eine weitere Möglichkeit

festzustellen, ob die Zelle den Rezeptor exprimiert, ist die direkte Messung der Expression durch molekularbiologische Methoden, z.B. durch PCR (Polymerase Chain Reaction) oder Northern Blots.

Vorzugsweise werden die Ausgangszellen für die Herstellung von (Prä)Testzellen danach ausgewählt, daß sie keine oder möglichst wenige der interessierenden Rezeptortypen endogen exprimieren, um sie mit möglichst vielen verschiedenen Rezeptortypen transformieren und damit für die Herstellung möglichst vieler verschiedener Testzellen geeignet zu machen.

Vorzugsweise werden Zellen eingesetzt, die nach Stimulierung mit Substanzen, die die IP₃/DAG-Konzentration erhöhen, starke Expression des TRE-regulierten Reportergens zeigen, bzw. Prätestzellen, die nach Stimulierung mit Substanzen, die den cAMP-Spiegel erhöhen, starke Expression des CRE-regulierten Reportergens zeigen. Um Testzellen zu erhalten, in denen die interessierenden Rezeptoren nach Einwirkung einer Droge effizient an den Phospholipase-Signalübertragungsweg koppeln, werden Säugetierzellen auf ihre Verwendbarkeit als Testzellen untersucht, indem sie zunächst mit Sensor-DNA transformiert werden (Prätestzellen), die ein oder mehrere TRE-Elemente enthalten oder die eine Sequenz enthalten, die für ein Protein kodiert, das durch Kalzium aktiviert wird. Die mit Sensor-DNA transformierte Prätestzelle wird daraufhin einerseits mit Substanzen, die eine Erhöhung der cAMP-Konzentration bewirken oder vortäuschen (z.B. mit Forskolin), andererseits mit Substanzen, die eine Erhöhung der IP₃/DAG-Konzentration bewirken oder vortäuschen (z.B. mit TPA), behandelt. Wenn die Zelle nur bei TPA-, nicht jedoch bei Forskolin-Behandlung ein Signal gibt, erfüllt sie die primäre Voraussetzung,

spezifisch auf Änderungen der IP₃/DAG-Konzentration anzusprechen, d.h. es findet in dieser Zelle kein Crosstalk auf Expressionsebene statt (für CRE-Testzellen wird entsprechend verfahren; die CRE-Prätestzelle spricht auf Forskolin an). Weiters wird die Prätestzelle zweckmäßigerweise darauf untersucht, ob eine für den einzuführenden Rezeptor physiologisch "richtige" Kopplung und damit Einleitung des Signalübertragungsweges stattfindet; Voraussetzung dafür ist u.a., daß die Zelle die für den Rezeptor spezifische G-Protein-Variante (bzw. eine G-Protein-Variante, die die Rezeptor-spezifische funktionell ersetzen kann) enthält. Für eine solche Untersuchung wird z.B. die Prätestzelle mit dem fraglichen Rezeptor transformiert, mit bekannten Liganden behandelt und überprüft, ob eine Modulation der Reportergenexpression stattfindet.

Voraussetzung für die Eignung einer Zelle für ihren Einsatz im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist weiters ihre Stabilität, und zwar sowohl im Hinblick auf ihre Verwendbarkeit als Prätestzelle (transformiert nur mit Sensor-DNA), als auch als Testzelle (transformiert mit Sensor- und Rezeptor-DNA). Um die Stabilität der Zellen (Lebensfähigkeit, stabile Integration der Fremd-DNA ins Genom) zu testen, werden über einen längeren Zeitraum unter identischen Bedingungen mit den Prätestzellen (Behandlung mit Substanzen, die die Second Messenger-Konzentration beeinflussen) und den Testzellen (Behandlung mit Rezeptor-Liganden) Versuche durchgeführt und die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse überprüft.

Beispiele für geeignete Zellen sind solche der Zelllinien CHO ("Chinese hamster ovary"-Zelllinie), COS (Affennieren-Zelllinie), A549 (humane Lungenkarzinom-

Zelllinie) und JEG-3 (humane Choriokarzinom-Zelllinie).

Die erfindungsgemäßen Prätestzellen dienen einerseits als Ausgangssubstrat für die Herstellung von Rezeptor-DNA enthaltenden Testzellen, andererseits werden sie im erfindungsgemäßen Verfahren als Kontrollzellen eingesetzt, um zu überprüfen, ob ein Signal auf eine rezeptorabhängige Modulation des Signalübertragungsweges durch die zu untersuchende Substanz zurückzuführen ist oder nicht. Erzeugt die Substanz in der Testzelle ein Signal und in der als Kontrollzelle verwendeten Prätestzelle nicht, ist die Modulation der durch das Signal erfaßten Expression des Reportergens ausschließlich rezeptorabhängig. Wenn auch die Kontrollzelle ein Signal gibt, beeinflusst die Substanz (auch) einen Prozeß im Signalübertragungsweg, der rezeptorunabhängig ist; der diesem Signal entsprechende Kontroll-Meßwert muß von dem in der Testzelle erhaltenen abgezogen werden.

Die Sensor-DNA befindet sich vorzugsweise auf einem Plasmid, das sich in einem geeigneten Wirtsorganismus, vorzugsweise E. coli, in hoher Kopienzahl vermehren läßt und nach Transfektion in Säugetierzellen und Integration ins Wirtsgenom die Expression eines Reportergens unter Kontrolle von regulatorischen Elementen ermöglicht. Es handelt sich dabei bevorzugt um einen Shuttle-Vektor, der eine Expressionskassette für das Reportergen (Sensor DNA) und einen selektionierbaren Marker für Säugetierzellen sowie mindestens einen Replikationsursprung und einen Marker für die Vermehrung und Selektion in E.coli enthält.

Zur Herstellung von permanenten Zelllinien, die die Sensor-DNA stabil in ihr Genom integriert enthalten, enthält der Vektor einen dominanten Selektionsmarker.

Die Verwendung eines bestimmten Selektionsmarkers ist nicht kritisch, geeignet sind z.B. das Gen für Neomycin-Phosphotransferase (neo), das eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin (G-418) verleiht (Southern und Berg, 1982), das DHFR-Gen (Dihydrofolatreduktase) für DHFR-defiziente Zellen, das Gen für Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (gpt), das Resistenz gegen Mycophenolsäure verleiht (Mulligan und Berg, 1981) oder das Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen (hph; Gritz und Davies, 1983). Beispiele für Promotoren, die das Selektionsmarker-Gen treiben, sind der SV40-Early-Promotor, der Cytomegalovirus-Promotor (CMV-Promotor), der Promotor des Thymidin-Kinase-Gens des Herpes simplex-Virus (TK-Promotor), der Rous Sarcoma Virus (RSV) long terminal repeat (LTR). Die Plasmide werden vorzugsweise derart konstruiert, daß einzelne wichtige Elemente, wie das Reportergen, der Promotor für das Reportergen, die regulatorischen Sequenzen für den Selektionsmarker, einfach ausgetauscht oder verändert werden können, um etwaigen geänderten Anforderungen, die sich aus dem speziellen Anwendungsfall ergeben, z.B. aufgrund der Verwendung einer anderen Zelllinie, entsprechen zu können. Derartige Maßnahmen bestehen z.B. darin, vor den/die Promotor(en) oder vor das Reportergen Multiklonierstellen einzubauen, um die Klonierung von regulatorischen, den Promotor modulierenden Sequenzen bzw. von verschiedenen Reportergenen zu ermöglichen.

Bei der Auswahl eines geeigneten Reportergens wurde davon ausgegangen, einen, vorzugsweise nicht-radioaktiven, automatisierbaren Assay mit hoher Empfindlichkeit bereitzustellen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können grundsätzlich sämtliche Reportergene eingesetzt werden,

die diese Voraussetzungen erfüllen:

Alkalische Phosphatase kann bei Verwendung eines chemilumineszierenden Substrats mit hoher Empfindlichkeit gemessen werden, weist allerdings den Nachteil auf, daß viele Säugetierzellen dieses Enzym relativ stark exprimieren. Es kommt daher als Reporter gen im allgemeinen nur für solche Zelllinien in Betracht, die es nicht oder nur schwach exprimieren.

Die Expressionsprodukte des β -Galaktosidase- und des β -Glucuronidase-Gens können das entsprechende Methylumbeliferyl-Galaktosid bzw. -Glucuronid unter Bildung fluoreszierender Gruppen spalten. Diese Enzymreaktionen werden mit Hilfe etablierter Fluoreszenz-Assays verfolgt (Wieland et al., 1985; Kricka, 1988).

Die Expression von Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) ist zwar relativ empfindlich nachweisbar, der Assay weist jedoch u.a. den Nachteil auf, daß er radioaktiv und schwer automatisierbar ist (Hartmann, 1991).

Bevorzugt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Reporter gen das für *Photinus pyralis*-Luciferase kodierende Gen (De Wet et al., 1987) verwendet. Dieses Enzym weist die Vorteile auf, daß es mit seinem Substrat Luciferin unter Zugabe von ATP Biolumineszenz in hoher Ausbeute erzeugt, die mit Hilfe etablierter, automatisierbarer Methoden gemessen werden kann, und daß dieses Enzym von Säugetierzellen nicht endogen produziert wird. Weiters hat Luciferase eine relativ kurze *in vivo* Halbwertszeit und ist auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch (Hartmann, 1991; Brasier et al., 1989). Die Messung der Aktivität der Firefly-

Luciferase mittels Biolumineszenz stellt eine der empfindlichsten Methoden einer Enzymbestimmung dar. Daher und aufgrund des Fehlens von Luciferaseaktivität in normalen Säugetierzellen ist dieses Enzym als Reporteragen in Studien zur Genregulation besonders geeignet (Subramani und DeLuca, 1987).

Ein Nachteil bei der Messung der Luciferase-Aktivität ist die geringe Stabilität des Lichtsignals unter Reaktionsbedingungen, die zur Erzielung einer maximalen Lichtausbeute optimal sind (DeLuca et al., 1979). Dies bedingt, daß die Messung der Luciferase-Aktivität am besten in Meßgeräten erfolgt, in denen die Messung des entstehenden Lichtes direkt nach Zugabe der Substratlösung mit den für die Lumineszenzreaktion erforderlichen Komponenten erfolgt. Ein weiteres Problem bei der Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Reporteragenstudien stellt die Lysierung der Zellen zur Freisetzung des Enzyms dar, wodurch ein weiterer Arbeitsschritt erforderlich wird (Brasier et al., 1989).

Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt ein Reagens zur Messung der Aktivität einer in Zellkulturen exprimierten Luciferase.

Mit dem erfindungsgemäßen Reagens wird eine direkte Messung der in Zellkulturen exprimierten Luciferase-Aktivität in einem einzigen Schritt ermöglicht. Dieses Reagens lysiert einerseits mittels eines Detergens die Zellen und enthält andererseits die für die Luciferasereaktion notwendigen Substrate. Durch dieses Reagens wird durch dessen Gehalt an ausgewählten Substanzen ein besonders konstantes Lichtsignal erhalten, wodurch die Messung der Luciferaseaktivität in einem Zeitraum zwischen 2 und 20 Minuten nach Zugabe

des Reagens ermöglicht wird. Weiters ist dieses Reagens im fertigen Zustand mindestens eine Woche stabil. Das Reagens besteht aus einem Grundpuffer, der geeignete Puffersubstanzen wie z.B.: Tricin, HEPES, Glycylglycin, Phosphat, Tris, bevorzugt Tricin (Leach und Webster, 1986) enthält. Der pH dieses Puffers liegt im Bereich zwischen 6 und 9, bevorzugt zwischen 7 und 8. Weiters wird dem Puffer ein Magnesiumsalz, bevorzugt Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in einer Konzentration zwischen 10 und

0.1 g/l, bevorzugt 4 g/l zugesetzt. Die erforderlichen Substrate für die Luciferasereaktion sind bevorzugt in folgenden Konzentrationen enthalten:

Adenosintriphosphat (ATP) von 0.05 bis 5 g/l, bevorzugt 0.7 g/l; Luciferin von 0.001 bis 0.1 g/l, bevorzugt 0.015 g/l. Der Puffer kann zusätzlich einen Komplexbildner wie Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA) in einer Menge von ca. 0.2 g/l enthalten.

Der bevorzugte Grundpuffer (plus Substrate für die Luciferase-Reaktion) setzt sich zusammen aus 25 mmol/l Tricin, 0.5 mmol/l EDTA, 16.3 mmol/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mmol/l ATP und 0.05 mmol/l Luciferin Na-Salz. Zur Stabilisierung der Luciferase wird ein mildes organisches Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT), β -Mercaptoethanol (BME), allein oder in Mischung mit anderen Reduktionsmitteln verwendet. Ein solches Reduktionsmittel verhindert die Oxidation von im Enzym vorhandenen SH-Gruppen und eine damit verbundene Desaktivierung der Luciferase während der Lumineszenz-Reaktion. DTT wird in einer Konzentration zwischen 0.1 und 50 g/l, vorzugsweise von 1 g/l verwendet. BME wird in einer Konzentration zwischen 0.1 und 50 ml/l, vorzugsweise 4 ml/l zugesetzt.

Zur Stabilisierung und Verstärkung der Lumineszenz wird gegebenenfalls zusätzlich Natriumtripolyphosphat (NaTPP) verwendet, welches in einer Konzentration zwischen 0.005 und 5 g/l, vorzugsweise 0.2 g/l zugesetzt wird. Statt Natriumtripolyphosphat kann auch Natriumpyrophosphat verwendet werden.

Zur Lysierung der Zellen wird ein geeignetes Detergens wie z.B. Triton X-100, Tween 20 oder 80, NP 40, Brij oder ähnliches verwendet. Triton X-100 wird in einer Konzentration zwischen 0.01 und 5 %, vorzugsweise 0.1 % verwendet.

Alternativ kann als Reportergen das für das Enzym Apoaeguorin der Qualle *Aequoria victoria* kodierende Gen (Tanahashi et al., 1990) verwendet werden. Dieses Enzym weist die Vorteile auf, daß es mit seinem Co-Faktor Coelenterazin nach Bindung von Kalziumionen Biolumineszenz in hoher Ausbeute erzeugt, die mit Hilfe etablierter, automatisierbarer Methoden gemessen werden kann. Ein weiterer Vorteil ist, daß dieses Enzym von Säugetierzellen nicht endogen exprimiert wird.

11

Bei der Konstruktion der Sensor-DNA wird das Reportergen unter die Kontrolle von konstitutiven, vorzugsweise schwachen, Promotor-Elementen gestellt, die durch ein oder mehrere vorgeschaltete TRE- bzw. CRE-Regulationselemente modulierbar sind. Die am besten geeignete Sensor-DNA-Konstruktion wird ermittelt, indem die Zelle transient mit verschiedenen Sensor-DNA-Plasmid-Konstrukten transformiert wird, wobei einerseits hinsichtlich des Reportergens, andererseits hinsichtlich der Kontrollsequenzen variiert werden kann, und die Messung des Reportergen-Produktes auf seine Empfindlichkeit untersucht wird. Dem Fachmann sind die für die Expression in bestimmten

Säugetierzellen geeigneten Kontrollsequenzen bekannt; die Auswahl kann zunächst aufgrund der einschlägigen Literatur getroffen werden (z.B. Landschulz et al., 1988, Turner und Tjian, 1989), eine Einengung bzw. Optimierung kann mit den oben angeführten, einfach durchzuführenden transienten Transfektionsexperimenten durchgeführt werden. Beispiele für geeignete Promotoren sind der β -Globin-Promotor und der TK-Promotor. Gegebenenfalls werden bekannte natürliche oder synthetische Promotoren modifiziert, z.B. durch Verkürzung auf die für die Promotorfunktion erforderliche Minimalsequenz. Gegebenenfalls wird die Regulationssequenz eines durch cAMP bzw. IP₃/DAG induzierbaren Gens verwendet, die Promotor und regulatorisches Element enthält (Montminy et. al., 1990, Deutsch et al. 1988), z.B. die 5'-regulatorische Sequenz des ICAM-1-Gens. Im Falle der Verwendung des Apoaequorings als Reportergen wird das Gen zweckmäßig unter die Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors gestellt.

Die Auswahl der in der Sensor DNA enthaltenen regulatorischen Sequenz (CRE- bzw. TRE-Element einschließlich seiner flankierenden Sequenzen) erfolgt im allgemeinen empirisch, wobei von literaturbekannten Elementen (s. z.B. Montminy et al., 1990, Deutsch et al., 1988) ausgegangen wird, die in Vorversuchen auf ihre Eignung im Hinblick auf eine empfindlich nachweisbare Induzierbarkeit des Reportergens in einem gegebenen Zellsystem untersucht werden. Beispiele für geeignete regulatorische Elemente, einschließlich deren flankierende Sequenzen, sind die Sequenzen von Somatostatin, "vasoactive intestinal peptide", Cytomegalovirus Enhancer, Rinder Leukämievirus-Long Terminal Repeat (BLV LTR) (CRE-Elemente) bzw. ICAM-1, Kollagenase, Parathyroidhormon (TRE-Elemente). Falls

die in den natürlichen Sequenzen enthaltenen TRE-bzw. CRE-Motive keine perfekte Konsensussequenz aufweisen, können sie, und gegebenenfalls auch die benachbarten Sequenzen, durch Austausch eines oder mehrerer Nukleotide verändert werden.

Die regulatorischen Elemente (TRE- bzw. CRE-Elemente) und die sie flankierenden Sequenzen können synthetisch hergestellt werden oder natürlichen Ursprungs sein. Wenn eine natürliche Sequenz verwendet werden soll, von der bekannt ist, daß sie in Abhängigkeit vom Zelltyp auf cAMP und/oder IP₃/DAG anspricht (Karin; 1989), wird sie in der Prätestzelle darauf untersucht, auf welchen Second Messenger sie anspricht, indem die Zellen z.B. mit TPA und Forskolin behandelt werden.

Gegebenenfalls enthält die Sensor-DNA ein oder mehrere CRE-Elemente neben einem oder mehreren TRE-Elementen. Mit einer solchen Sensor-DNA werden sowohl die Aktivierung des einen oder des anderen Signalübertragungsweges einzeln oder auch die parallele Aktivierung beider Signalübertragungswege erfaßt.

Um den modulierenden Effekt von IP₃/DAG und/oder cAMP auf die Reporterexpression zu verstärken, wird gegebenenfalls ein Konstrukt verwendet, das mehrere regulatorische CRE- und/oder TRE-Sequenzen in Tandem enthält. Vorzugsweise enthält die regulatorische Sequenz drei bis zwölf TRE- und/oder CRE-Elemente. Bei der Anordnung der Einzelelemente des Konstrukts wird der Abstand der TRE- und/oder CRE-Elemente zueinander so gewählt, daß die Bindung des Transkriptionsfaktors an die CRE- bzw. TRE-Elemente gewährleistet ist. Der optimale Abstand der regulatorischen TRE- bzw. CRE-Elemente zueinander, bei dessen Bestimmung auch Überlegungen bezüglich der sterischen Anordnung zum

Tragen kommen, wird in Vorversuchen empirisch ermittelt, gegebenenfalls auch der Abstand zu anderen regulatorischen-DNA-Elementen, die einen Einfluß auf die Transkription haben, z.B. von der TATA-Box. Die TRE- bzw. CRE-Elemente und/oder die flankierenden Sequenzen können identisch oder, zumindest teilweise, verschieden sein, letztere Ausführungsform wird für die Tandem-Konstruktion bevorzugt.

Als das CRE- bzw. TRE-Element flankierende Sequenzen, von denen festgestellt wurde, daß sie ebenfalls Einfluß auf die Regulationseigenschaften der CRE- bzw. TRE-Elemente haben, werden bevorzugt, insbesondere in deren unmittelbarer Umgebung, die das spezielle regulatorische Element natürlicherweise umgebenden Sequenzen verwendet (Montminy et al., 1990, Deutsch et al., 1988). Die Sequenz bzw. deren Anordnung wird empirisch ermittelt.

Gegebenenfalls befinden sich die Elemente der Sensor-DNA und das zur Selektion benutzte Markergen auf zwei getrennten Plasmiden, wovon eines das Reportergenkonstrukt (einschließlich der Expressionskontrollsequenz, die die regulatorische Sequenz enthält) und eines das Selektionsmarkergenkonstrukt enthält. (Beispiele für geeignete Selektionsmarkergenkonstrukte sind die Plasmide pRSVneo, pSV2neo, pRSVgpt, pSV2gpt, deren Aufbau einschlägigen Handbüchern, z.B. "Cloning Vectors", entnommen werden kann.) Im Fall der Verwendung von getrennten Plasmiden werden die Zellen mit den beiden Plasmiden co-transfiziert und auf den Marker selektioniert. Das Vorhandensein des Selektionsmarkers läßt den Schluß zu, daß die Zelle auch das Reportergenkonstrukt enthält, weil bekannt ist, daß Co-Transformation zweier Gene, die sich auf

physikalisch nicht miteinander verbundenen DNA-Segmenten befinden, häufig zur Expression beider co-transformierter Gene führt (Winnacker, 1985).

Im Hinblick auf die im Testverfahren einzusetzende Meßanordnung ist es zweckmäßig, das Verhältnis zwischen maximaler Änderung und Normalwert des Meßsignals zu optimieren, vorzugsweise durch Veränderung der Konstruktion der Sensor-DNA, z.B. durch strukturelle Veränderung der Promotoranordnung. Das Background-Signal ist bevorzugt niedrig genug, um eine Induktion der Reportergenexpression mit hoher Empfindlichkeit zu erfassen, andererseits aber hoch genug, um die Nachweisgrenze im Hinblick auf die Negativkontrolle bestimmen zu können.

Für das Rezeptor-DNA-Konstrukt gelten grundsätzlich dieselben Überlegungen wie für das Sensor-DNA-Konstrukt mit dem Unterschied, daß die Rezeptor-Sequenz bevorzugt unter die Kontrolle eines starken, konstitutiven Promotors gestellt wird. Gegebenenfalls befinden sich auch im Falle der Rezeptor-DNA die für den Rezeptor kodierende Sequenz und der dominante Selektionsmarker auf zwei getrennten Plasmiden, mit denen die Zellen co-transformiert werden.

Die Transfektion der Zellen mit Sensor- bzw. Rezeptor-DNA wird mit üblichen Transfektionsmethoden vorgenommen (vgl. z.B. Potter et al. 1984; Felgner et al., 1987), bevorzugt werden die Elektroporations-, die Calciumphosphat-Präzipitations- oder die Lipofektionsmethode eingesetzt.

Im allgemeinen werden die Zellen zuerst mit Sensor-DNA transformiert, um Prätestzellen zu erhalten, im Anschluß daran wird die Prätestzelle mit Rezeptor-DNA

transformiert, um die Testzelle herzustellen.

Die Konstruktion der Sensor-DNA wird bevorzugt im Hinblick auf maximale Induzierbarkeit durch ein einziges spezifisches Effektorsystem der Prätest- bzw. der Testzelle optimiert, wobei minimale Induzierbarkeit durch andere Effektorsysteme angestrebt wird. Die TRE-Testzelle spricht somit vorzugsweise spezifisch auf Substanzen an, die den Phospholipase C-Signalübertragungsweg rezeptorabhängig modulieren. (Um eine rezeptorunabhängige Beeinflussung durch die zu untersuchende Substanz auszuschließen, wird, wie bereits angeführt, die entsprechende TRE-Prätestzelle parallel mit der Substanz behandelt. Um eine Aussage über die Spezifität der Substanz auf das Phospholipase C-Effektorsystem zu erlauben, wird gegebenenfalls als Negativ-Kontrolle eine Messung durchgeführt, bei der die Prätestzelle mit CRE-Sensor-DNA und die davon abgeleitete Testzelle zusätzlich mit dem zu untersuchenden identischen Rezeptor transformiert ist.)

Zur Kontrolle der Spezifität der Beeinflussung des Phospholipase C-Signalübertragungsweges bezüglich des untersuchten Rezeptors (bzw. Rezeptor-Subtyps) durch die aufgefundene Substanz werden zweckmäßigerweise für weitere Kontrollversuche TRE-Prätestzellen mit verschiedenen anderen Rezeptoren transformiert und mit der Substanz behandelt. Wenn eine Substanz nur einen Rezeptor spezifisch beeinflussen darf, was im Hinblick auf die Spezifität einer Droge im allgemeinen der Fall ist, darf die Substanz nur diesen einen Rezeptor modulieren.

Als Rezeptoren für die Transfektion von TRE-Prätestzellen, um TRE-Testzellen zu erhalten, sind sämtliche Rezeptoren geeignet, die mit dem

Phospholipase C-Signalübertragungsweg koppeln können. Dazu zählen: α -Adrenoceptor(Adrenalin)-Rezeptoren vom α_1 -Typ, Angiotensin II-Rezeptoren, Atrionatriuretischer Peptid-Rezeptor, Bombesin-Rezeptoren, Bradykinin-Rezeptoren, Cholecystokinin- und Gastrin-Rezeptoren, Endothelin-Rezeptoren, metabotrophische excitatorische Aminosäure-Rezeptoren, Histamin-Rezeptor (H_1), Serotonin-Rezeptoren ($5-HT_{1C}$, $5-HT_2$), Leukotrien-Rezeptoren (LTB_4 , LTD_4), muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren (M_1 , M_3 , M_5), Neuropeptid Y-Rezeptoren (auch PYY, NPY), Neurotensin-Rezeptor, PAF (Platelet Activating Factor)-Rezeptor, Prostanoid-Rezeptoren (EP_{1-3} , FP, TP), P_2 -Purinorezeptor ($P_2\gamma$), Neurokinin-Rezeptoren ($NK_{1,2,3}$), Vasopressin- und Oxytocin-Rezeptoren (V_{1A} , V_{1B} , OT), Thrombin-Rezeptor, etc. Manche dieser Rezeptoren können auch an andere Effektoren, wie Adenylatzyklase, koppeln. Die angeführten und weitere geeignete Rezeptoren sowie das Effektorsystem, an das die Rezeptoren gekoppelt sind, sind der Fachliteratur entnehmbar; eine Übersicht findet sich im TiPS Receptor Nomenclature Supplement, 1991.

Beispiele für nicht-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Phospholipase-C aktivieren und die daher im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Transfektion der Substratzellen verwendet werden können, sind Mitglieder der Familien der FGF-Rezeptoren, Insulin-Rezeptoren, PDGF-Rezeptoren, EGF-Rezeptoren, etc. (Ullrich und Schlessinger, 1990).

Rezeptoren, die an das Adenylatzyklase-Effektorsystem koppeln können und die zur Transfektion von CRE-Prätestzellen verwendet werden können, um CRE-Testzellen zu erhalten, sind ebenfalls dem TiPS Receptor Nomenclature Supplement, 1991, entnehmbar.

Beispielhaft seien die Rezeptoren für Adenosin (A₁, A₂), für Adrenalin (β - und α ₂-Typ), für Dopamin (D₁, D₂₁ (= D_{2A}), D_{2s} (= D_{2B}), D₅) für Histidin (H₂-Typ), für Serotonin (5-HT_{1A}- und 5-HT_{1D}-Typ, 5-HT₄), für Acetylcholin (M₂- bzw. M₄-Typ) und für Enkephaline genannt.

(Sofern ein Rezeptor eingesetzt werden soll, der noch nicht kloniert wurde bzw. von dem die cDNA nicht in entsprechenden Vektoren zur Verfügung steht, kann die Rezeptor-DNA, z.B. durch Screenen von cDNA- oder genomischen Banken, erhalten und kloniert werden.)

Für den Fall, daß ein Rezeptor negativ an Adenylatzyklase gekoppelt ist

(z.B. Acetylcholinrezeptoren vom M₂- bzw. M₄-Typ, Neuropeptid Y-Rezeptor), d.h. eine Aktivierung des Rezeptors eine Senkung der cAMP-Konzentration bewirkt, wird die Senkung der cAMP-Konzentration zweckmäßigerweise wie folgt gemessen: die Zellen werden mit der zu untersuchenden Substanz behandelt; falls es sich um eine agonistisch wirkende Substanz handelt, wird der Rezeptor aktiviert, was eine Senkung des cAMP-Spiegels zur Folge hat. Gleichzeitig bzw. gegebenenfalls anschließend daran wird die Zelle mit einer Substanz behandelt, von der bekannt ist, daß sie die cAMP-Konzentration erhöht. Es kann auch umgekehrt zuerst die cAMP-Konzentration erhöht und dann mit den interessierenden Substanzen inkubiert werden.

(Die Erhöhung des cAMP-Spiegels kann direkt erfolgen, z.B. mit Forskolin, oder indirekt, indem die Zellen mit einer Substanz behandelt werden, die agonistische Wirkung auf einen Rezeptor hat, der mit Adenylatzyklase positiv gekoppelt ist. Bei diesem Rezeptor handelt es sich entweder um einen endogenen Rezeptor oder um einen Rezeptor, mit dem die Zelle co-transformiert wurde.)

Als Kontrolle wird in einem parallelen Testansatz, bei identischen Inkubationsbedingungen, nur die Erhöhung der cAMP-Konzentration bestimmt. Der Unterschied in den Signalwerten entspricht der Senkung der cAMP-Konzentration, die auf die Wirkung der Substanz zurückzuführen ist; sie ist ein Maß für die rezeptorabhängige Senkung der Adenylatzyklaseaktivität. Die indirekte Messung der Rezeptoraktivierung bei negativer Adenylatzyklase-Kopplung ist erforderlich, wenn die natürlicherweise in der Zelle vorhandene cAMP-Konzentration sehr niedrig und daher eine Senkung dieser Konzentration meßtechnisch nicht erfaßbar ist.

Rezeptoren, durch deren Aktivierung neben dem Phospholipase C-Signalübertragungsweg, u.a. aufgrund von Crosstalk, das Adenylatzyklase-Effektorsystem moduliert wird, können im Rahmen der vorliegenden Erfindung ebenfalls verwendet werden. Wenn die Sensor-DNA nur auf die Konzentrationsänderung von IP₃/DAG anspricht (TRE-Sensor-DNA), wird ein Signal nur dann erzeugt, wenn ein Transkriptionsfaktor aktiviert wird, der an das TRE-Element bindet. Es spielt dabei keine Rolle, wenn parallel auch das Adenylatzyklase-Effektorsystem aktiviert wird und das Signal oder ein Anteil davon aufgrund eines Crosstalks erzeugt worden ist.

Nach Transformation der Zellen mit Rezeptor-DNA werden die positiven Klone, z.B. mit Hilfe von Bindungsassays, in denen bekannte radioaktiv markierte Agonisten und Antagonisten eingesetzt werden, auf die Expression des Rezeptors untersucht.

Mit Hilfe von Scatchard-Blots (Human Pharmacology, 1991) kann die Rezeptorzahl in Molekülen pro Zelle bestimmt werden.

Bevorzugt wird aus den stabilen, Rezeptor-DNA enthaltenden Transformanten ein Klon mit einer Rezeptorzahl gewählt, die der physiologischen Rezeptorkonzentration möglichst entspricht. (Ist die Rezeptorzahl zu hoch, kann der Fall eintreten, daß unvollständige und möglicherweise unspezifische Kopplung stattfindet oder daß zusätzlich zur spezifischen Kopplung eine unspezifische Kopplung stattfindet, wodurch gegebenenfalls andere Effektorsysteme mitaktiviert werden. Ist die Rezeptorzahl zu niedrig, ist das Signal gegebenenfalls zu niedrig, um durch die Messung erfaßt zu werden.)

Ein Rezeptor bzw. Rezeptorsubtyp kann in zwei verschiedene Prätestzellen transfektiert werden, wobei eine davon auf die IP3/DAG-Konzentration, die andere auf die cAMP-Konzentration anspricht. (Die parallel verwendete Zelle wird mit der für das andere Effektorsystem, z.B. das Adenylatzyklase-Effektorsystem, spezifischen Sensor-DNA daraufhin untersucht, ob sie spezifisch über den cAMP-Signalübertragungsweg aktiviert wird, indem sie getrennt mit Substanzen behandelt wird, die die cAMP- bzw. die IP3/DAG Konzentration erhöhen oder eine solche Konzentrationserhöhung vortäuschen, z.B. mit Forskolin und TPA. Für diese Vorversuche können die Zellen entweder nur mit Sensor-DNA transformiert sein, wobei eine stabile Transformation nicht erforderlich ist, oder auch mit der Rezeptor-DNA co-transformiert sein; in letzterem Fall dürfen sich im Medium keine Substanzen befinden, die den Rezeptor aktivieren. Nachdem festgestellt wurde, daß die Zellen nur auf Forskolin ansprechen, wird der mit TRE/Rezeptor-transformierten Zellen vorgenommene Assay unter denselben Bedingungen mit CRE-Testzellen wiederholt.) Durch Vergleich der

Daten, die mit einer bestimmten Substanz und einem bestimmten Rezeptor(subtyp) in den spezifischen TRE- und in den spezifischen CRE-Zellen sowie in einer Testzelle, die auf IP3/DAG und auf cAMP anspricht, erhalten wurden, kann festgestellt werden, in welchem Ausmaß das Signal auf Crosstalk und in welchem Ausmaß es auf Beeinflussung von nur einem der beiden Effektorsysteme zurückzuführen ist.

Bei den mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens auf ihre potentielle pharmakologische Wirkung zu untersuchenden Substanzen handelt es sich um natürliche oder synthetische Substanzen, wobei Reinsubstanzen oder Substanzgemische (z.B. Pflanzenextrakte, Fermentationsbrühen, etc.) eingesetzt werden können. Bei den Reinsubstanzen sind insbesondere niedermolekulare synthetische organische Verbindungen von Interesse. Zweckmäßig werden die Substanzen in seriellen Verdünnungen auf die Zellen aufgebracht, um einen möglichst großen Konzentrationsbereich zu erfassen. Die Inkubationszeit wird empirisch bestimmt, indem z.B. die gegebenen Testzellen mit bekannten Rezeptor-Agonisten behandelt werden und der Zeitpunkt bestimmt wird, ab dem die Induktion der Reporterexpression reproduzierbar gemessen werden kann. Die Inkubationszeit wird im allgemeinen auf diesen Zeitpunkt abgestellt, sie beträgt im allgemeinen mindestens 1 h. Die absolute Zahl der Testzellen ist nicht kritisch. Die Zellzahl richtet sich vor allem nach der Nachweisgrenze des Meßsignals und nach dem Wachstumsstadium, in dem sich die Zellen befinden, die Untergrenze wird außerdem durch die technisch bedingte Fähigkeit definiert, die Zellen gleichmäßig auf die Testeinheiten zu verteilen. Die Zellzahl beträgt im Fall der Verwendung von Microtiterplatten mit 96 Vertiefungen z.B. ca. 10.000 bis ca. 200.000 Zellen

pro Testeinheit, kann jedoch auch bei entsprechender Empfindlichkeit des Meßsignals und exakter Verteilbarkeit der Zellen geringer sein. Das Wachstumsstadium, in dem die Zellen eingesetzt werden, hängt von den zelltypspezifischen Eigenschaften der Ausgangszelle ab, weiters wird es vor allem durch den jeweiligen Rezeptor bestimmt (bei verschiedenen Rezeptoren kann dasselbe Effektorsystem je nach Wachstumsstadium unterschiedlich bzw. unterschiedlich stark aktiviert werden); Wachstumsstadium und Zellzahl werden somit ebenfalls in Vorversuchen empirisch ermittelt, indem die Kinetik der Reportergenexpression in Prätest- und Testzellen verschiedenen Wachstumsstadiums bestimmt wird.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß verschiedene mit TRE-Sensor-DNA transformierte Zellen (TRE-Prätestzellen) auf den Zusatz von Substanzen, von denen bekannt ist, daß sie DAG vortäuschen (womit dieser Zusatz für die Zelle gleichbedeutend ist einer durch Phospholipase C-Aktivierung hervorgerufenen Erhöhung des DAG-Spiegels) ansprechen, wodurch die Expression des Reportergens induziert wird, während sie auf cAMP-erhöhende Substanzen nicht ansprechen. (Die Sensor-DNA enthielt als regulatorisches Element die 1.3 kb 5'-flankierende Region des humanen ICAM-1-Gens (Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1), die ein TRE-Element enthält, oder mehrere in Tandem angeordnete TRE-Elemente des ICAM-1-Gens). Wenn die TRE-Prätestzellen mit einem Rezeptor transformiert wurden, der spezifisch an den Phospholipase C-Signalübertragungsweg gekoppelt ist (es wurden der humane 5-HT₂-Rezeptor, der Neurokinin₂-Rezeptor und der humane M₃-Rezeptor verwendet), wurde nach Behandlung mit Rezeptor-Agonisten die Expression des Luciferasegens gemessen; die durch die Agonisten

vermittelte Induktion wurde durch Zugabe von Antagonisten wieder aufgehoben. Andererseits konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, wenn die Phospholipase C-gekoppelten Rezeptoren in Prätestzellen transformiert wurden, die auf cAMP ansprechen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte weiters gezeigt werden, daß in mit CRE-Sensor-DNA transformierten CHO-Zellen (CRE-Prätestzellen) die Expression des CRE-regulierten Reportergens nur durch Substanzen erhöht wird, die die Konzentration von cAMP erhöhen. Die Behandlung der CRE-Prätestzellen mit Substanzen, die eine Erhöhung der IP₃/DAG-Konzentration bewirken oder vortäuschen, ergab keine Induktion der Luciferase-Expression, ebenso wenig die Behandlung mit Substanzen, die Agonisten für Dopamin- und muskarinische Acetylcholinrezeptoren sind. Letzteres Ergebnis zeigte, daß die Zellen diese Rezeptoren nicht endogen exprimieren. Wenn die CRE-Prätestzellen mit einem positiv an das Adenylatzyklase-Effektorsystem gekoppelten Rezeptor (es wurde der Dopamin-D₁-Rezeptor verwendet) transfektiert wurden, konnte die Luciferase-Expression mit Agonisten für den D₁-Rezeptor induziert und diese Induktion durch Antagonisten wieder aufgehoben werden.

Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung wird ein empfindliches und vielseitiges funktionelles Verfahren zum Auffinden von Substanzen bereitgestellt, die rezeptorabhängig einen Signalübertragungsweg in der Zelle spezifisch beeinflussen. Die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ermittelten Substanzen dienen als Leitsubstanzen für die Entwicklung von Medikamenten für die Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Fehlfunktion eines Signalübertragungsweges assoziiert sind, und können in weiterer Folge, z.B. in

einem sekundären Screening mit Primärzellen und erst im Anschluß daran im Tierversuch, näher auf ihre pharmakologischen Eigenschaften untersucht werden. Die Anzahl der benötigten Tiere wird somit durch den Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens beträchtlich verringert.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet außerdem den Vorteil, daß es automatisierbar ist, indem die Beschickung der Zellkulturgefäße, z.B. Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, die Beschickung mit den Testsubstanzlösungen, die Inkubations- und Waschschrte sowie die Messung, z.B. im Fall von Luciferase als Reportergenprodukt mit einem Luminometer, mit Robotern durchgeführt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich somit für Screening-Programme mit hoher Durchsatz-Kapazität, wobei beispielsweise ca. 2000 Substanzen bzw. Substanzgemische pro Woche getestet werden können.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich, allosterisch wirkende Substanzen und bezüglich der Ligandenbindungsstelle nicht-kompetitiv wirkende Substanzen erfassen zu können.

Ein Vorteil dieses Systems besteht weiters darin, daß für den Fall, daß für einen bestimmten mehrstufigen rezeptorabhängigen intrazellulären Signalübertragungsweg mehrere Möglichkeiten für das Eingreifen einer Substanz bestehen, die Aussichten steigen, die günstigsten Parameter für die Modulation eines bestimmten Signalübertragungsweges ermitteln zu können. Die Vielseitigkeit des Systems bezüglich der großen Zahl einsetzbarer Rezeptoren und Rezeptor-Subtypen ermöglicht seinen Einsatz zum Auffinden von pharmakologisch wirksamen Substanzen für

unterschiedliche Indikationsgebiete. Das erfindungsgemäße System ermöglicht es außerdem, bei gezielter Auswahl bestimmter Rezeptoren und Rezeptor-Subtypen mit hoher Spezifität zwischen Schlüssel-Mechanismen in verschiedenen Zellsystemen, z.B. dem Zentralnervensystem und dem peripheren System zu unterscheiden.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es weiters möglich, Rezeptoren zu klonieren, die pharmakologisch oder biochemisch charakterisiert und für die Liganden bekannt sind. Dabei wird von cDNA- oder genomischen Banken ausgegangen, von denen Pools in die entsprechende Prätestzelllinie transformiert werden. Die Expression des Rezeptors wird durch eine Expression des Reportergens angezeigt, nachdem der Rezeptor durch Bindung eines Liganden aktiviert wurde.

Figurenübersicht:

- Fig. 1: Konstruktion des Plasmids pADneo
- Fig. 2: BglII - BamHI-Fragment nach PCR für die Konstruktion von Plasmid pADneoTK
- Fig. 3: Konstruktion des Plasmids pADneoTK
- Fig. 4A: Plasmid pADneoTKluci
- Fig. 4B: Plasmid pADneoBGluci
- Fig. 5: Konstruktion des Plasmids pRc/RSVΔNaeI
- Fig. 6: Konstruktion des Plasmids pRc/RSVneo
- Fig. 7: Konstruktion des Plasmids pADneo2BGluci
- Fig. 8: Oligonukleotidsequenzen, enthaltend drei CRE-Elemente
- Fig. 9: Konstruktion des Plasmids pADneo2-6C-BGL, enthaltend sechs CRE-Elemente
- Fig. 10: Plasmid pHEBo
- Fig. 11: Plasmid p290

- Fig. 12: Plasmid pAHygCMV1
- Fig. 13: Plasmid pAHygCMV2
- Fig. 14: Plasmid pBHLuc1.3
- Fig. 15: Plasmid pADneo(1.3ICAM)luci, enthaltend die 5'-regulatorische Sequenz des ICAM-1-Gens
- Fig. 16: Plasmid pADneo(3TRE)BGLuci, enthaltend drei TRE-Elemente des ICAM-1-Gens
- Fig. 17: Plasmid pAD-CMV2-5HT2, enthaltend die für den 5HT2-Rezeptor kodierende Sequenz
- Fig. 18: Plasmid pAD-CMV2:D1, enthaltend die für den Dopamin-D1-Rezeptor kodierende Sequenz
- Fig. 19A: Plasmid pAHyg-NK2, enthaltend die für den NK2-Rezeptor kodierende Sequenz
- Fig. 19B: Plasmid pAHyg-5HT2, enthaltend die für den 5HT2-Rezeptor kodierende Sequenz
- Fig. 20: Induktion von TRE-Sensor-DNA (pBHLuc1.3) durch TPA in den Zelllinien A549, HeLa und COS-7
- Fig. 21A: Induktion von TRE-Sensor-DNA (pBHLuc1.3) durch TPA, nicht aber durch Forskolin, in HeLa-Zellen
- Fig. 21B: Induktion von TRE-Sensor-DNA (pBHLuc1.3) durch TPA, nicht aber durch Forskolin, in COS 7-Zellen
- Fig. 22: Induktion von TRE-Sensor-DNA (pADneo(3TRE)BGLuci) durch TPA, nicht jedoch durch Forskolin in den Zelllinien A549, HeLa und COS 7
- Fig. 23A: Induktion von TRE-Sensor-DNA, in der drei bzw. sechs TRE-Elemente in unterschiedlichem Abstand zueinander enthalten sind, durch TPA in COS 7-Zellen
- Fig. 23B: Induktion von TRE-Sensor-DNA, in der drei bzw. sechs TRE-Elemente in unterschiedlichem Abstand zueinander enthalten sind, durch TPA in A549-Zellen
- Fig. 24: Induktion von TRE-Sensor-DNA

(pADneo(3TRE)BGluci) durch Bindung einer agonistisch wirkenden Substanz an den muskarinischen M3-Rezeptor in COS 7-Zellen

Fig. 25: A) Induktion von TRE-Sensor-DNA (pBHLuc1.3) durch Bindung einer agonistisch wirkenden Substanz an den 5HT₂-Rezeptor in COS 7-Zellen, transformiert mit 5HT₂-Rezeptor-DNA

B) keine Induktion von CRE-Sensor-DNA (pADneo2-C6-BGL) durch eine für den 5HT₂-Rezeptor agonistisch wirkende Substanz in COS 7-Zellen, transformiert mit 5HT₂-Rezeptor-DNA

Fig. 26: A) Induktion von TRE-Sensor-DNA (pBHLuc1.3) durch TPA, nicht jedoch durch eine für den Dopamin-D₁-Rezeptor agonistisch wirkende Substanz in COS 7-Zellen, transformiert mit Dopamin-D₁-Rezeptor-DNA

B) Induktion von CRE-Sensor-DNA (pADneo2-C6-BGL) durch Forskolin und durch Bindung einer agonistisch wirkenden Substanz an den Dopamin-D₁-Rezeptor in COS 7-Zellen, transformiert mit Dopamin-D₁-Rezeptor-DNA

Fig. 27: Induktion der Luciferaseexpression in der TRE-Prä-Testzelllinie A20 und in der den humanen Neurokinin2-Rezeptor exprimierenden TRE-Testzelllinie A20/NK2-122

Fig. 28: Kinetik der Luciferaseinduktion mittels eines NK2-spezifischen Agonisten

Fig. 29A: Dosis-Wirkungskurven der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen Neurokinin2-Rezeptors durch Neurokinine

Fig. 29B: Dosis-Wirkungskurven der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen Neurokinin2-Rezeptors durch Agonisten für einen Neurokinin-Rezeptor

Fig. 30: Inhibierung der agonistischen Wirkung von

Neurokinin A durch NK2-spezifische Antagonisten

- Fig. 31: Kinetik der durch Serotonin induzierten Luciferaseexpression in einer den 5HT2-Rezeptor exprimierenden Testzelllinie
- Fig. 32A: Dosis-Wirkungskurven der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen 5HT2-Rezeptors durch Agonisten
- Fig. 32B: Dosis-Wirkungskurven der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen 5HT2-Rezeptors durch Antagonisten
- Fig. 33: Behandlung von CRE-Prätestzellen (CHO-Zellen, stabil transformiert mit pADneo2-C6-BGL) mit verschiedenen Substanzen, die die cAMP- oder die IP₃/DAG-Konzentration ändern oder eine Konzentrationsänderung vortäuschen, oder mit rezeptorspezifischen Agonisten
- Fig. 34: Dosis-Wirkungskurve der transkriptionellen Aktivierung des Luciferasegens in CRE-Prätestzellen durch Forskolin
- Fig. 35A: Kinetik der Luciferase-Induktion in CHO-Zellen in Abhängigkeit der Forskolindosis
- Fig. 35B: Kinetik der Luciferase-Induktion in CHO-Zellen in Abhängigkeit der Forskolindosis (ED₅₀-Bestimmung)
- Fig. 36: Behandlung von CHO-Prätest- und Testzellen, stabil transformiert mit CRE-Sensor-DNA und mit Dopamin-D₁-Rezeptor-DNA, mit verschiedenen Substanzen
- Fig. 37A, 37B, 38A und 38B: Dosis-Wirkungskurven der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Aktivierung des Dopamin-D₁-Rezeptors
- Fig. 39A, 39B: Dosis-Wirkungskurven der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Aktivierung des Dopamin-D₅-Rezeptors
- Fig. 40: Optimierung eines Reagens zur Messung der

Luciferase-Aktivität

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert:

Die Wirkung der in den Beispielen verwendeten Substanzen ist in folgender Tabelle angegeben:

A23187	Ca ²⁺ -Ionophor
Apomorphin	Agonist für den Dopamin-Rezeptor
Atropin	Antagonist für muskarinische Rezeptoren (unspezifisch)
Bromocryptin	Agonist für den Dopamin-Rezeptor
Carbachol	Agonist für muskarinische Rezeptoren
Clozapin	Antagonist für den Dopamin-Rezeptor (D ₄ -spezifisch)
dibutyryl-cAMP (dbcAMP)	membranpermeables cAMP-Derivat
Dopamin	Agonist für den Dopamin-Rezeptor
Flupenthixol	Antagonist für den Dopamin-Rezeptor (D ₁ -spezifisch)
Forskolin	Stimulator der Adenylat-Zyklase (Erhöhung von cAMP)
Haloperidol	Antagonist für den Dopamin-Rezeptor (D ₂ -spezifisch)
IBMX	Phosphodiesterase Inhibitor (Akkumulation von cAMP)
Ketanserin	Antagonist für den Serotonin- Rezeptor (5-HT ₂ -spezifisch)
PMA (TPA)	Protein Kinase C Aktivator, täuscht DAG vor
SCH23390	Antagonist für den Dopamin-Rezeptor (D ₁ -spezifisch)
Serotonin (5-HT)	Agonist für Serotonin-Rezeptoren
Spiroperidol	Antagonist (5-HT ₂ > 5-HT _{1A} -Rezeptor)

> Dopamin-Rezeptor)

(=Spiperon)

SKF-38393

Antagonist für den Dopamin-Rezeptor
(D1-spezifisch)

Beispiel 1

Herstellung von Grundvektoren für die Expression von
Reportergenen in Säugetierzellen

a) Konstruktion von Plasmid pADneo

Aus Teilen der Plasmide pBluescript SK+ (Short et al., 1988; Stratagene, La Jolla, CA) und pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA; Katalog Nr. V750-20) wurde ein Plasmid hergestellt, das Replikationsursprung (ori) und Selektionsmarker für Ampicillinresistenz (Amp, β -Lactamase) in E.coli enthält. Die intergenische Region von M13 ermöglicht die Herstellung einzelsträngiger Plasmid-DNA nach Superinfektion der transformierten Bakterien mit einem Helferphagen (z.B. R408 oder M13K07; Stratagene) zur erleichterten Sequenzierung und Mutagenese der Plasmid-DNA. Weiters sind das Neomycin-Phosphotransferasegen (neo) unter der transkriptionellen Kontrolle des SV40 early Promotors (SV40) und das SV40 Polyadenylierungssignals (SV40 poly(A)) enthalten.

Das Plasmid pBluescript SK+ wurde mit HindIII linearisiert und 100 ng DNA in einem 100 μ l PCR (Saiki et al., 1988) -Ansatz eingesetzt (Reaktionsmedium: 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01 % (w/v) Gelatine, je 0.2 mM der vier Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 2.5 Einheiten Taq Polymerase pro 100 μ l). Als Primer

wurden je 50 pmol der synthetischen Oligonukleotide EBI-1730 (SEQ ID NO:3) (5'-GGAATTTCGCGCCCTGTAGCGGCG-3') und EBI-2134 (SEQ ID NO:4) (5'-CACTGAACTCGAGCAGCTGC-GTTGCTGGCGTTTTTCC-3') eingesetzt. Nach 5 min Denaturieren bei 94°C erfolgte die PCR über 10 Zyklen (Zyklusbedingungen: 40 sec bei 94°C, 45 sec bei 55°C, 5 min bei 72°C, Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler). Die Oligonukleotide flankieren die intergenische Region von M13 bzw. den Replikationsursprung (ori) mit dem dazwischenliegenden Gen für die β -Lactamase. Gleichzeitig wird am Ende des ori eine XhoI- und am anderen Ende eine EcoRI-Schnittstelle erzeugt (in der Oligonukleotidsequenz unterstrichen). Das Reaktionsgemisch wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform von Protein befreit und die DNA mit Äthanol präzipitiert. Die erhaltene DNA wurde mit XhoI und EcoRI geschnitten und nach Elektrophorese in einem Agarosegel ein Fragment mit 2.2 kb isoliert.

Das Plasmid pRc/CMV wurde mit EcoRI und SalI doppelt geschnitten, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und ein 1.5 kb Fragment isoliert, das den SV40-Promotor, das neo-Gen und das SV40 poly(A)-Signal enthält. 100 ng der 2.2 kb Vektor-DNA wurden mit der zwei- bis dreifachen Menge an 1.5 kb Insert-DNA über Nacht bei 14°C mit T4 DNA-Ligase inkubiert, anschließend wurden für die Aufnahme von DNA kompetent gemachte (Chung und Miller, 1988) E.coli JM101-Zellen transformiert und auf Ampicillinresistenz selektioniert. Von den entstandenen Kolonien wurde die Plasmid-DNA präpariert und durch Schneiden mit verschiedenen Restriktionsenzymen charakterisiert. Ein Plasmid der gewünschten Struktur wurde pADneo benannt (Fig.1).

b) Konstruktion von Plasmid pADneoTK

In das Plasmid pADneo wurde die Promotorregion des Thymidinkinase (TK)-Gens des Herpes Simplex Virus Typ I (HSV-I), flankiert von zwei Polyklonierstellen, eingefügt. Dieses DNA Fragment wurde durch PCR hergestellt. Als Vorlage für den TK-Promotor wurde das Plasmid pX1 (Wagner et al., 1981) verwendet, die Polyklonierstellen wurden durch Verlängerungen der Amplifikationsprimer am 5'-Ende, die nicht mehr komplementär zur Vorlage sind, erzeugt. 100 ng Plasmid pX1 wurden mit je 50 pmol der Oligonukleotide EBI-2983 (SEQ ID NO:5) (5'-GACTTCAGATCTGCGGCCGCCTCGAGG-GTACCGTTAACGTCGACAAACCCCGCCCAGCGTCTTG-3') und EBI-2984 (SEQ ID NO:6) (5'-GACTTCGGATCCGAGCTCACTAGTTCTAG-AAAGCTTGACGCTGTTAAGCGGGTCGC-3') 20 PCR Zyklen (Zyklusbedingungen: 40 sec 94°C, 45 sec 55°C, 1 min 72°C) unterworfen. Nach Entfernung der Taq Polymerase durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Äthanol-fällung der DNA wurden die Enden mit BamHI und BglIII nachgeschnitten (unterstrichene Sequenz) und das 0.2 kb Fragment nach Elektrophorese aus einem Agarosegel isoliert (Fig.2). Anschließend wurde diese DNA mit BamHI-linearisiertem Plasmid pADneo ligiert und E.coli JM101 transformiert. Ein erhaltenes Plasmid, das den TK-Promotor in der gleichen Orientierung wie das neo-Gen enthielt, wurde pADneoTK benannt (Fig.3). Es enthält 5' vom TK-Promotor singuläre Schnittstellen für NotI, XhoI, KpnI, HpaI und SalI zur Klonierung von regulatorischen, den Promotor modulierenden Sequenzen, sowie 3' vom TK-Promotor singuläre Schnittstellen für HindIII, XbaI, SpeI, SacI und BamHI zur Insertion eines Reportergens.

c) Konstruktion von Plasmid pADneoTKluci

Das Gen für die *Photinus pyralis* Luciferase mit der SV40 poly(A) Region wurde aus einem Derivat von Plasmid

pSV232AL-AA5' (De Wet et al., 1987), pBhluc (Voraberger et al., 1991) als 2.5 kb HindIII-BamHI-Fragment isoliert. pADneoTK wurde mit HindIII und BamHI doppelt geschnitten und mit dem 2.5 kb HindIII-BamHI Fragment aus dem Plasmid pBhluc ligiert. Ein nach Transformation von E.coli JM101 erhaltenes Plasmid der gewünschten Struktur wurde pADneoTKluci benannt (Fig.4A). Dieses Plasmid erlaubt die Expression von Luciferase unter der Kontrolle des TK-Promotors in Säugetierzellen.

d) Konstruktion von Plasmid pADneoBGluci

Für die Optimierung der Induktionsfähigkeit der Reportergens wurde der TK-Promotor durch eine minimale Promotorsequenz des Kaninchen β -Globin-Gens ersetzt. Plasmid pADneoTKluci wurde mit SalI und HindIII doppelt geschnitten und der Vektoranteil aus einem Agarosegel isoliert. Der β -Globin Promotor mit flankierenden SalI- und HindIII-kompatiblen Enden wurde durch die synthetischen Oligonukleotide EBI-3182 (SEQ ID NO:7) (5'-GACTTCGGATCCGAGCTCACTAGTTCTAGAAAGCTTGACGCTG-TTAAGCGGGTCGC-3') und EBI-3184 (SEQ ID NO:8) (5'-AGCTTGTAAGCAGCAGCTGCAGTGCTCTGCCTTTTATGCCCAAGG-3') hergestellt. Die beiden Oligonukleotide wurden am 5'-Ende durch Inkubation mit T4-Polynukleotidkinase und ATP phosphoryliert und anschließend mit dem oben beschriebenen Vektor ligiert. Ein nach Transformation von E.coli JM101 erhaltenes Plasmid, das die korrekte Sequenz enthielt, wurde pADneoBGluci benannt (Fig.4B).

e) Konstruktion von Plasmiden pRc/RSV Δ NaeI und pRc/RSVneo

Für die Verwendung von Sensor-DNA in Zelllinien, welche die Replikation von Plasmiden mit SV40 Replikationsursprung erlauben (z.B. Cos-7 (ATCC

CRL1651) und 293 (ATCC CRL1573)), war es für vergleichende Studien mit anderen Zelllinien wünschenswert, den SV40 Promotor, unter dessen Kontrolle das neo-Gen in den zuvor beschriebenen Plasmiden steht, gegen einen anderen Promotor (z.B. Rous Sarcoma Virus (RSV) long terminal repeat (LTR)) zu ersetzen.

Um eine neue Expressionskassette für das neo-Gen herzustellen, wurden die nachfolgend beschriebenen Plasmide pRc/RSV Δ NaeI und pRc/RSVneo hergestellt.

Plasmid pRc/RSV (Invitrogen, San Diego, CA; Katalog Nr. V780-20) wurde mit NaeI geschnitten, der 3.8 kb Vektoranteil aus einem Agarosegel isoliert und religiert. Dadurch wurde das 1.6 kb Fragment mit dem neo-Gen deletiert. Das erhaltene Plasmid wurde pRc/RSV Δ NaeI benannt (Fig.5).

pRc/RSV Δ NaeI wurde mit HindIII und XbaI doppelt geschnitten und die DNA Enden durch anschließende Behandlung mit dem Klenow Fragment der E.coli DNA Polymerase (Klenow-Enzym) in Gegenwart aller vier Desoxynukleotide stumpf gemacht.

Plasmid pADneo wurde mit EcoRV und BstBI doppelt geschnitten, die DNA Enden ebenso durch anschließende Behandlung mit Klenow-Enzym stumpf gemacht und ein 0.86 kb DNA Fragment, welches das neo-Gen enthält, isoliert. Nach Ligation mit dem oben beschriebenen Vektor und Transformation wurde ein erhaltenes Plasmid der gewünschten Struktur pRc/RSVneo benannt (Fig.6). Dieses Plasmid enthält das neo-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des RSV Promotors und die Polyadenylierungssignale des Rinderwachstumshormons (bGH) und von SV40.

f) Konstruktion von Plasmid pADneo2BGluci

Die Expressionskassette SV40 Promotor - neo-Gen - SV40 poly(A) Signal von pADneoBGluci wurde gegen die Expressionskassette RSV Promotor - neo-Gen - bGH poly(A) aus Plasmid pRc/RSVneo ausgetauscht.

Das Plasmid pRc/RSVneo wurde mit XhoI geschnitten und die DNA Enden anschließend mit Klenow-Enzym stumpf gemacht. Ein XhoI-NotI-Adapter, hergestellt aus den Oligonukleotiden EBI-3285 (SEQ ID NO:9) (5'-TCGATGCGGCCGCGACTTCAG-3') und EBI-3286 (SEQ ID NO:10) (5'-CTGAAGTCGCGGCCGCA-3'), wurde mit der geschnittenen pRc/RSVneo DNA ligiert. Dadurch wird die XhoI-Schnittstelle zerstört und eine NotI Stelle (unterstrichen) eingeführt. Nach Hitzeinaktivierung der DNA-Ligase wurde die DNA mit NruI und NotI doppelt geschnitten und ein 1.54 kb Fragment aus einem Agarosegel isoliert. Dieses DNA Fragment enthält die RSV-neo-bGH-poly(A)-Kassette.

Plasmid pADneoBGluci wurde mit EcoRI partiell geschnitten, die Enden mit Klenow-Enzym begradigt und anschließend mit NotI nachgeschnitten. Ein 4.9 kb langes DNA Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert und mit dem zuvor beschriebenen 1.54 kb NruI - NotI - Fragment ligiert. Ein nach Transformation von E.coli erhaltenes Plasmid der gewünschten Struktur wurde pADneo2BGluci benannt (Fig.7).

g) Konstruktion von Reporterplasmiden mit durch cAMP regulierbaren Elementen (CRE-Sensor-DNA)

Zur Kontrolle einer eventuellen Querempfindlichkeit der Sensor-DNA für IP_3 /DAG (enthaltend TRE-Elemente) wurde

die Expressionskassette für das Luciferase-Reportergen unter die Kontrolle von verschiedenen CRE-Elementen gestellt. Die Auswahl der CRE-Sequenzen erfolgte nach der Zusammenstellung von charakterisierten CRE-Elementen (Montminy et al., 1990). Es wurden CRE-Sequenzen gewählt, welche einerseits die perfekte 8 Basen lange, palindromische Konsensussequenz TGACGTCA und andererseits möglichst keine größeren Gruppierungen von GC-Paaren aufwiesen, die Ähnlichkeit mit den Erkennungssequenzen für Spl-Transkriptionsfaktoren (CCGCCC oder GGGCGG) in den umgebenden Sequenzen enthalten. Es wurden mehrere CRE-Sequenzen in Tandem verwendet, um den modulierenden Effekt von cAMP zu verstärken. Eine Kombination unterschiedlicher CRE-Sequenzen wurde verwendet, um zu vermeiden, daß Klonierung und Stabilität in E.coli ungünstig beeinflußt werden, wenn vollkommen identische Sequenzen in mehreren Wiederholungen auftreten.

Durch Einsetzen synthetischer Oligonukleotide in das Plasmid pADneo2BGluci 5' zum β -Globin-Promotor wurden zwei Plasmide mit je 3 hintereinanderliegenden CRE-Sequenzen (pADneo2-C3BVC-BGL und pADneo2-C3SVC-BGL), und durch Kombination dieser Plasmide das Plasmid pADneo2-C6-BGL mit 6 CRE-Sequenzen hergestellt.

Die dreifachen CRE-Sequenzen wurden durch Ligation von zwei Oligonukleotidpaaren mit zueinander komplementären DNA Enden hergestellt (Fig.8). Je 20 pmol Oligonukleotid EBI-3489 (SEQ ID NO:11) (5'-GGCAGCTGACGTCAGTGTCTGGTGC-3') und EBI-3491 (SEQ ID NO:12) (5'-CTCCTTGGCTGACGTCAGTAGAGAGATCCCATGGC-3') wurden in 15 μ l Kinasepuffer (70 mM Tris-HCl pH 7.6; 10 mM $MgCl_2$, 5 mM Dithiotreitol, 2 mM ATP) mit 15 Einheiten Polynukleotid-Kinase 1 h bei 37°C inkubiert und das Enzym durch Hitze (5 min bei 95°C)

inaktiviert. In gleicher Weise wurde das 5'-Ende der Oligonukleotide EBI-3490 (SEQ ID NO:13) (5'-CTCTACTGACGTCAGC-CAAGGAGGTAC-3') und EBI-3494 (SEQ ID NO:14) (5'-CGTCATACTGTGACGTCTTTCAGACACCCCAT-TGACGTCAATGGGAG-3') phosphoryliert.

Äquimolare Mengen der jeweils komplementären Oligonukleotide ohne 5'-Phosphatgruppe wurden mit den phosphorylierten Oligonukleotiden gemischt: EBI-3492 (SEQ ID NO:15) (5'-GGCCGCACCAGACAGTGACGTCAGCT-GCCAGATCCCATGGC-3') mit EBI-3489; EBI-3491 (SEQ ID NO:16) (5'-CTCCTTGGCTGACGTCAGTAGAGAGATCCCATGGC-3') mit EBI-3490; EBI-3493 (SEQ ID NO:17) (5'-TCGACTCC-CATTGACGTCAATGGGGTGTCTGAAAGACGTCACAGTATGACG-GCCATGGGATCT-3') mit EBI-3494 und durch 5 min Inkubation bei 56°C angelagert. Jeweils 10 pmol der nun doppelsträngigen Oligonukleotidpaare EBI-3489 / EBI-3492 und EBI-3493 / EBI-3494 wurden in 30 µl Ligationspuffer (70 mM Tris-HCl pH 7.6; 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiotreitol, 1 mM ATP) mit 1 Einheit T4 DNA-Ligase über Nacht bei 14°C inkubiert und das Enzym anschließend 10 min bei 70°C inaktiviert. Die ligierten Oligonukleotidpaare wurden am 5'-Ende in 50 µl Kinasepuffer mit 15 Einheiten Polynukleotid-Kinase 1 h bei 37°C phosphoryliert.

In gleicher Weise wurden die Oligonukleotidpaare EBI-3490 / EBI-3491 und EBI-3493 / EBI-3494 miteinander verbunden und anschließend phosphoryliert.

100 ng mit NotI und SalI doppelt geschnittenes Plasmid pADneo2BGluci wurden mit 0.2 pmol ligiertem Oligonukleotidkomplex aus EBI-3489/3492/3493/3494 in 20 µl Ligationspuffer mit 1 Einheit T4 DNA-Ligase 4 h bei 22°C inkubiert und anschließend E.coli JM101 transformiert. Daraus erhaltene Plasmide wurden der

Sequenzanalyse unterworfen und ein Plasmid der gewünschten Struktur wurde pADneo2-C3BVC-BGL benannt (Fig.9). Dieses Plasmid enthält 3 CRE-Sequenzen, abgeleitet von Bovine Leukemia Virus LTR (BLV), Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) und Cytomegalovirus Promotor (CMV). (Die Plasmidbezeichnung nimmt auf diese Sequenzen durch die Abkürzung "BVC" Bezug.)

In analoger Weise wurde der Oligonukleotidkomplex EBI-3490/3491/3493/3494 in mit KpnI und SalI doppelt geschnittenen Plasmidvektor pADneo2BGluci geklont und Plasmid pADneo2-C3SVC-BGL erhalten (Fig.9). Dieses Plasmid enthält 3 CRE-Sequenzen, abgeleitet von Somatostatin (Som), VIP und CMV. (Die Plasmidbezeichnung nimmt auf diese Sequenzen durch die Abkürzung "SVC" Bezug.)

Zur Herstellung eines Plasmids mit 6 CRE-Sequenzen wurde das Plasmid pADneo2-C3BVC-BGL mit BamHI und SalI doppelt geschnitten und der 3.8 kb Vektoranteil aus einem Agarosegel isoliert. Plasmid pADneo2-C3SVC-BGL wurde mit BamHI und XhoI doppelt geschnitten und das 2.7 kb Insert isoliert. Diese beiden DNA Fragmente wurden ligiert, E.coli transformiert. Ein erhaltenes Plasmid der gewünschten Struktur wurde pADneo2-C6-BGL benannt (Fig.9).

h) Herstellung von Grundvektoren für die Expression von Genen in Säugetierzellen mit Hygromycin B Resistenzmarker

Ausgehend von den Expressionsplasmiden pAD-CMV1 und pAD-CMV2 (EP-A 393 438) und pHEBo (Sugden et al. 1985) wurden Plasmide für die Expression von Genen oder cDNAs unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV Promoter/Enhancers und die Selektion für Hygromycin B

Resistenz hergestellt.

Plasmid pHEBo (Sugden et al. 1985; Fig. 10), welches das bakterielle Hygromycin-B-Phosphotransferase Gen (Gritz und Davies 1983) unter der transkriptionellen Kontrolle des HSV Thymidin Kinase Promoters (McKnight 1980) enthält, wurde mit ClaI geschnitten, die DNA Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und anschließend mit BamHI geschnitten. In diesen Vektor wurde ein 0,76 kb BamHI-HindIII Fragment (BamHI Ende mit Klenow Enzym aufgefüllt) mit der CMV Promoter/Enhancer Sequenz (Stinski und Roehr 1985) kloniert und Plasmid p290 (Fig. 11) erhalten.

Das SpeI-EcoRV Fragment von Plasmid p290, das CMV Promoter und EBV ori P enthält, wurde herausgeschnitten. Plasmid pAD-CMV1 wurde mit BglII geschnitten, die DNA Enden mit Klenow Enzym stumpf gemacht und anschließend mit SpeI geschnitten. Das Gel-gereinigte 1,6 kb DNA Fragment, das CMV Promoter, Polyklonierstelle, SV40 Splice und poly(A) Signale enthält, wurde mit dem zuvor beschriebenen p290 Vektorteil ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde pAHygCMV1 benannt (Fig. 12).

Auf gleiche Weise wurde aus Plasmid pAD-CMV2 das SpeI-BglII Fragment isoliert und mit dem p290 SpeI-EcoRV Vektorteil ligiert. Das erhaltene Plasmid, welches die Polyklonierstelle in umgekehrter Orientierung als in pAHygCMV1 enthält, wurde pAHygCMV2 benannt (Fig. 13).

Die vollständige Nukleotidsequenz des Plasmids pAHygCMV1 ist in SEQ ID NO:36 wiedergegeben.

Die Abschnitte auf dem Plasmid pAHygCMV1 (angegeben in der Numerierung der Basen) entsprechen folgenden

Sequenzen:

1 - 767	CMV Promoter
768 - 785	T7 Promoter
794 - 854	Polyklonierstelle
854 - 1552	SV40 t Intron und poly- Adenylierungssignale
1553 - 1736	5' nicht kodierende Region des Hamster DHFR Gens
1737 - 2261	EBV ori P Teilsequenz
2262 - 2856	HSV Thymidin Kinase 3' nicht kodierende Region mit poly-Adenylierungssignal
2857 - 3912	Hygromycin B Phosphotransferase Gen
3913 - 4161	HSV Thymidin Kinase Promoter
4162 - 6531	pBR322 Vektor Teil
6532 - 6623	Linkersequenzen entstanden aus diversen Kloniervorgängen, teilweise von plink322 (Maniatis et al. 1982)

Die Nukleotidsequenz des Plasmids pAHygCMV2 ist in SEQ ID NO:37 wiedergegeben. Sie unterscheidet sich von pAHygCMV1 nur im Bereich der Polyklonierstelle; das Cytosin an Position 856 in pAHygCMV2 entspricht Cytosin an Position 849 in pAHygCMV1.

Beispiel 2

Konstruktion von Reporterplasmiden mit durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA) induzierbaren Elementen (TRE-Sensor-DNA)

Klonierung und Deletionsanalyse von 1.3 kb der 5'-flankierenden Region des humanen Gens für das Interzelluläre Adhensionsmolekül ICAM-1 haben ergeben, daß dieses Fragment i) in der Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 (ATCC CCL 185) durch TPA induziert,

jedoch nicht durch Forskolin aktiviert werden kann, und ii) ein TPA Response Element (TRE) mit der DNA Sequenz TGATTCA enthält (Voraberger et al., 1991). Das 1.3 kb lange ICAM-1 Fragment, bzw. Oligonukleotide, die drei TRE-Elemente in Tandem-Orientierung enthalten, wurde daher zur Konstruktion von Vektoren verwendet, in denen das Luciferase-Gen durch TPA induziert werden kann.

a) Herstellung des Plasmids pBHLuc1.3

Das Plasmid pBHLuc1.3 (Fig. 14) enthält die 1.3 kb lange Regulationsregion des ICAM-1 Gens, die dem Luciferase-Gen vorgeschaltet ist. Seine Herstellung wurde von Voraberger et al., 1991, beschrieben.

b) Herstellung des Plasmids pADneo(1.3ICAM)luci (TRE-Sensor-DNA)

Aus dem Plasmid pADneo2BGluci (siehe Beispiel 1) wurde zuerst der β -Globin-Promotor herausgeschnitten, indem das Plasmid mit den Restriktionsenzymen SalI und HindIII geschnitten, die DNA-Enden des Plasmids durch Zugabe aller 4 dNTPs und von Klenow-Enzym "blunt end" gemacht, und schließlich das Plasmid durch Zugabe von T4-DNA-Ligase religiert wurde. Dieses Plasmid ohne β -Globin-Promotor, genannt pADneo2luci, wurde anschließend mit NotI und KpnI geschnitten, das 1.3 kb lange ICAM-1 Fragment wurde aus dem Plasmid Bluescript KS (siehe Voraberger et al., 1991) ebenfalls mit NotI und KpnI herausgeschnitten und in pADneo2luci hineinligiert. Dieses Plasmid, das pADneo(1.3ICAM)luci genannt wurde (Fig. 15), enthält die Regulations- und Promotorregion von ICAM-1, vorgeschaltet dem Luciferase-Gen.

c) Herstellung des Plasmids pADneo(3TRE)BGluci (TRE-Sensor-DNA)

Dieses Plasmid wurde durch Einsetzen von synthetischen Oligonukleotiden, kodierend für die Restriktionsstellen KpnI, BglII und XhoI, gefolgt von 3 hintereinanderliegenden TRE-Sequenzen, 5' zum β -Globin Promotor von Plasmid pADneo2BGluci hergestellt. Hierzu wurden die Oligonukleotide EBI-3677 (SEQ ID NO:18) (5'-GGCCGCAGGTACCAGATCTACTCGAGTGTAGACCGTGATTCAAGCT-TAGCTGTAGAC-3'), EBI-3671 (SEQ ID NO:19) (5'-GCTTGAATCACGGTCTACACTCGAGTAGATCTGGTACCTGC-3'), EBI-3678 (SEQ ID NO:20) (5'-TCGACTAAGCTTGAATCACGGTC-TACAGCTAAGCTTGAATCACGGTCTACAGCTAA-3') und EBI-3672 (SEQ ID NO:21) (5'-CGTGATTCAAGCTTAGCTGTAGACCGTGAT-TCAAGCTTAG-3') phosphoryliert und äquimolare Mengen der komplementären Oligonukleotide EBI-3677 und EBI-3671; und EBI-3678 und EBI-3672 aneinander angelagert, wie in Beispiel 1 beschrieben. Der Vektor pADneo2BGluci wurde mit NotI und SalI geschnitten, und äquimolare Mengen an geschnittenem Plasmid pADneo2BGluci, des Oligonukleotidpaares EBI-3677/3671 und des Oligonukleotidpaares EBI-3672/3678 wurden zusammengemischt und durch Zugabe von T4-DNA-Ligase miteinander ligiert. Daraus erhaltene Plasmide wurden der Sequenzanalyse unterworfen und ein Plasmid, das die gewünschten drei TRE-Sequenzen enthält, wurde pADneo(3TRE)BGluci genannt (Fig. 16).

d) Herstellung der Plasmide pADneo(nTREDx)BGluci

Diese Plasmide enthalten eine Anzahl von n TRE-Elementen, deren Abstand untereinander x Basen beträgt. Die Herstellung der Plasmide pADneo(3xTRED16)BGluci, pADneo(3xTRED21)BGluci, pADneo(3xTRED24)BGluci und pADneo(3xTRED34)BGluci unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide erfolgte wie unter c) beschrieben:

EBI-3775 (SEQ ID NO:22) (5'-GGCCGCAGGTACCAGATCTAC-

TCGAGTGTAGACCGTGATTCAAGCTTAGTGTAGAC-3') und Komplement-Oligonukleotid EBI-3671 (siehe oben), EBI-3776 (SEQ ID NO:23) (5'-TCGACCTTGAATCACGGTCTACACTAAGCTTG-AATCACGGTCTACACTAA-3') und Komplement-Oligonukleotid EBI-3777 (SEQ ID NO:24) (5'-CGTGATTCAAGCTTAGTGTAG-ACCGTGATTCAAGG-3') für pADneo(3xTRED16)BGluci;

EBI-3771 (SEQU ID NO:25) (5'-GGCCGCAGGTACCAG-ATCTACTCGAGTGTAGACCGTGATTCAAGCTTAGCCTG-3') und Komplement-Oligonukleotid EBI-3671 (siehe oben), EBI-3772 (SEQ ID NO:26) (5'-TCGACTAAGCTTGAATCACGGTC-TACACCAGGCTAAGCTTGAATCACGGTCTACACCAGGCTAA-3') und Komplement-Oligonukleotid EBI-3774 (SEQ ID NO:27) (5'-GTGTAGACCGTGATTCAAGCTTAGCCTGGTGTAGACCG-TGATTCAAGCTTAG-3') für pADneo(3xTRED21)BGluci;

EBI-3780 (SEQ ID NO:28) (5'-GGCCGCAGGTACCAG-ATCTACTCGAGTGTAGACCGTGATTCAAGCTTAGCCTGGCCGGTGTAGAC-3') und Komplement-Oligonukleotid EBI-3778 (SEQ ID NO:29) (5'-CCAGGCTAAGCTTGAATCACGGTCTACACTCGAGTAGATCTGGTACCTGC-3'), EBI-3779 (SEQ ID NO:30) (5'-CGTGATTCAAGCTTAGCCTGGCCGGTGTAGACCGTGATTCAAGCTTAGCCTG-3') und Komplement-Oligonukleotid EBI-3781 (SEQ ID NO:31) (5'-TCGACAGGCTAAGCTTGAATCACGGTCTACACCGCCAGGCTAAGCTTGAA-TCACGGTCTACACCG-3') für pADneo(3xTRED24)BGluci;

EBI-3786 (SEQ ID NO:32) (5'-GGCCGCAGGTACCAGATC-TACTCGAGTGTAGACCGTGATTCAAGCTTAGCCTGGCCGGTGTAGCG-CGGTGTAGAC-3') und Komplement-Oligonukleotid EBI-3782 (SEQ ID NO:33) (5'-CGCGCTAACCGGCCAGGCTAAGCTTGAATC-ACGGTCTACACTCGAGTAGATCTGGTACCTGC-3'), EBI-3790 (SEQ ID NO:34) (5'-TCGACAGGCTAAGCTTGAATCACGGTC-TACACCGCGCTAACCGGCCAGGCTAAGCTTGAATCACGGTCTACAC-3') und Komplement-Oligonukleotid EBI-3791 (SEQ ID NO:35) (5'-CGTGATTCAAGCTTAGCCTGGCCGGTGTAGCGGGTGTAGACCGTGATTCA-AGCTTAGCCTG-3') für pADneo(3xTRED34)BGluci.

Um die entsprechenden Plasmide mit 6 TRE-Elementen zu erhalten, wurden die jeweiligen Plasmide mit 3 TRE-Elementen mit NotI und XhoI geschnitten und die entsprechenden Oligonukleotide nochmals hineinligiert. Bedingt durch die Konstruktion der Oligonukleotide ergibt sich dadurch eine Verdopplung der TRE-Elemente mit den entsprechenden Abständen. Die erhaltenen Plasmide wurden pADneo(6xTREd16)BGluci, pADneo(6xTREd21)BGluci, pADneo(6xTREd24)BGluci und pADneo(6xTREd34)BGluci genannt.

Beispiel 3:

Klonierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und Herstellung von Expressionsplasmiden (Rezeptor-DNA)

Die cDNA des interessierenden humanen 5-HT₂-Rezeptors wurde durch Screenen einer cDNA-Bank erhalten und in die Expressionsvektoren pAD-CMV1 bzw. pAD-CMV2 (EP-A 393 438) hineinkloniert.

a) Isolierung eines Klons, enthaltend die für den humanen 5-HT₂-Rezeptor kodierende Sequenz

Durch Homologiescreenen einer humanen Hippocampus cDNA Bank im Lambda ZAP Vektor (Stratagene 936205) mit einem Klon, enthaltend die Ratten-5-HT₂-Rezeptorsequenz (Julius et al., 1990, Pritchett et al., 1988), wurde ein Klon isoliert und das Insert, enthalten im Plasmid pBluescript SK, sequenziert. Die erhaltene DNA- und die abgeleitete Aminosäuresequenz sind in SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 angegeben. Der Vergleich der Aminosäuresequenz des humanen 5-HT₂-Rezeptors mit der publizierten Aminosäuresequenz des Ratten 5-HT₂-

Rezeptors (Julius et al., 1990) ergab eine Übereinstimmung der beiden Aminosäuresequenzen von 90 %.

b) Subklonierung der 5-HT₂-Rezeptorsequenz in den Expressionsvektor pAD-CMV2

Der Expressionsvektor pAD-CMV2 wurde mit EcoRI geschnitten, die DNA-Enden durch Zugabe aller 4 dNTPs und von Klenow-Enzym "blunt end" gemacht, und der Vektor danach mit BamHI geschnitten. In diesen Vektor wurde die mit SmaI und BamHI aus dem Plasmid pBluescript herausgeschnittene 5-HT₂-Rezeptorsequenz hineinligiert, und ein so erhaltener Klon wurde pAD-CMV2-5HT₂ genannt (Fig. 17).

c) Klonierung der Dopamin-D₁-Rezeptor-Sequenz in den Expressionsvektor pAD-CMV2

Plasmid pHD₁-Gem, das ein 3 kb EcoRI-SacI Fragment der humanen Dopamin-D₁-Rezeptor-Sequenz in pGEM Blue Plasmid Vektor (Promega) enthält (Zhou et al., 1990), wurde mit EcoRI und BamHI doppelt geschnitten und das 3 kb DNA-Insert isoliert. Expressionsplasmid pAD-CMV2 (EP-A 393 438) wurde mit EcoRI und BamHI doppelt geschnitten und das 3 kb D₁-Rezeptor-Fragment gerichtet kloniert, sodaß die Transkription des Dopamin-D₁-Rezeptors unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV) Promotor/Enhancer Elements steht. Das erhaltene Plasmid wurde pAD-CMV2:D₁ benannt (Fig. 18).

d) Subklonierung der NK₂- bzw. der 5HT₂-Rezeptorsequenz in den Expressionsvektor pAHygCMV1

Die cDNA des humanen NK₂-Rezeptors wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme SalI und NotI aus dem Plasmid

pBluescript-NK2, das die NK2-Rezeptor cDNA im Plasmid Vektor pBluescript SK+ (Stratagene) enthält (Gerard et al., 1990), herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pAHygCMV1 (s. Beispiel 1 h)) kloniert und das dadurch entstandene Plasmid pAHyg-NK2 genannt (Fig. 19A).

Die 5HT2-Rezeptorsequenz wurde als XbaI-ClaI Fragment aus dem oben beschriebenen Vektor pAD-CMV2-5HT2 herausgeschnitten und in den Vektor pAHygCMV2 (s. Beispiel 1h) kloniert. Das so erhaltene Konstrukt wurde pAHyg-5HT2 genannt (Fig.19B).

Beispiel 4:

Induktion von TRE-Sensor-DNA durch TPA in drei verschiedenen Prätestzelllinien

Es wurden folgende Zelllinien mit TRE-Sensor-DNA (pBHLuc1.3) transient transfiziert: die humane Lungenkarzinom-Zelllinie A549 (ATCC CCL 185), die humane Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa (ATCC CCL 2) und die Affennieren-Zelllinie COS-7 (ATCC CRL 1651), wobei A549- und COS-7 Zellen in RPMI-1640 Medium (Gibco) und HeLa Zellen in MEM Medium mit Earle's BSS (Gibco) jeweils mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) angesetzt und bei 37°C in 5 % CO₂ inkubiert wurden. Etwa 1x10⁷ Zellen pro Transfektion wurden mit Trypsin von der Oberfläche der Kulturschale gelöst und 5 min bei 1200 UpM bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Heraeus Minifuge), einmal mit 5 ml serumfreiem Medium gewaschen, 5 min bei 1200 UpM zentrifugiert und in 1 ml serumfreiem Medium suspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 250 µg/ml DEAE-Dextran, 5 µg Plasmid DNA und 50 µg/ml Chloroquin versetzt, 30 min bei 37°C inkubiert, einmal mit Medium ohne FCS gewaschen und mit 10 ml frischem serumhaltigen Medium bei 37°C über Nacht

inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt, und nach 4 h wurden die Zellen induziert, und zwar entweder mit 10 ng TPA/ml Medium oder mit 20 μ M Forskolin. Nach weiteren 18 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Gummischaber von der Petrischale gelöst und 5 min bei 1200 UpM bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Heraeus Minifuge). Die Zellen wurden durch Zugabe von 100 μ l Lysierpuffer (1 % Triton X-100, 25 mM Glycylglycin pH 7.8, 15 mM $MgSO_4$, 4 mM EDTA und 1 mM DDT) lysiert, das Lysat 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Der Luciferase-Assay (De Wet et al., 1985) wurde durchgeführt, indem 30 μ l vom Überstand zu 350 μ l Assay-Puffer (25 mM Glycylglycin pH 7.8, 5 mM ATP, 15 mM $MgSO_4$) zugegeben, das Röhrchen in das Luminometer Lumat 9501 (Berthold) gestellt und die Reaktion durch Injektion von 300 μ l Injektionspuffer (0.2 mM Luciferin, 20 mM Glycylglycin pH 7.8) gestartet wurde. Die Meßzeit der Lichtemission betrug 10 sec.

a) Induktion von pBHLuc1.3 durch TPA, aber nicht durch Forskolin

Die Zelllinien A549, HeLa und COS-7 wurden durch Zugabe von Plasmid pBHLuc1.3 transient transfiziert, wie oben beschrieben, und durch Zugabe von TPA induziert. Als negative Kontrolle dienten Zellen, die nur transfiziert, aber nicht induziert wurden. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und der Luciferase-Assay durchgeführt. Das Ergebnis des Experiments ist in Fig. 20 zu sehen und zeigt, daß Plasmid pBHLuc1.3 in den getesteten Zellen mehr als 10-fach induzierbar ist. Voraberger et al., 1991, haben gezeigt, daß dieses Konstrukt in A549 Zellen nicht durch Forskolin induziert werden kann. Um dieses Ergebnis auch für HeLa und COS-7 Zellen zu verifizieren, wurden diese Zellen in einem weiteren

Experiment wieder mit pBHLuc1.3 transfiziert und entweder mit TPA oder mit Forskolin induziert, wobei wieder nicht-induzierte Zellen als Kontrolle dienten. Als Ergebnis dieser Versuche konnte auch für HeLa und COS-7 Zellen gezeigt werden, daß diese zwar durch TPA, aber nicht durch Forskolin induzierbar sind, wie in den Fig. 21A und 21B zu sehen ist.

b) Induktion von pADneo(3TRE)BGluci durch TPA, aber nicht durch Forskolin

Die Zelllinien A549, HeLa und COS-7 wurden durch Zugabe von Plasmid pADneo(3TRE)BGluci transient transfiziert und durch Zugabe von TPA oder Forskolin induziert. Als negative Kontrolle dienten wieder Zellen, die nur transfiziert, aber nicht induziert worden waren. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und der Luciferase-Assay durchgeführt. Das Ergebnis des Experiments ist in Fig. 22 zu sehen und zeigt, daß auch dieser Vektor, der nur die TRE-Elemente des ICAM-1 Gens enthält, in den getesteten Zellen durch TPA, nicht aber durch Forskolin induzierbar ist.

c) Induktion der Plasmide pADneo(nTREDx)BGluci durch TPA, aber nicht durch Forskolin

Die Zelllinien COS-7 und A549 wurden durch Zugabe von Plasmid
pADneo(3xTRED16)BGluci, pADneo(3xTRED21)BGluci,
pADneo(3xTRED24)BGluci, pADneo(3xTRED34)BGluci,
pADneo(6xTRED16)BGluci, pADneo(6xTRED21)BGluci,
pADneo(6xTRED24)BGluci oder pADneo(6xTRED34)BGluci
transient transfiziert und durch Zugabe von TPA oder
Forskolin induziert. Als negative Kontrolle dienten
wieder Zellen, die nur transfiziert, aber nicht
induziert wurden. Nach der angegebenen Inkubationszeit

wurden die Zellen lysiert und der Luciferase-Assay durchgeführt. Das Ergebnis des Experiments ist in Fig. 23A und 23B zu sehen und zeigt, daß i) die Induktion mit TPA für die Konstruktionen mit 6 TRE-Elementen höher ist als für die Konstruktionen mit 3 TRE-Elementen (keine der Konstruktionen ist mit Forskolin induzierbar), und ii) die Induktion mit TPA für die Konstruktionen mit 6 TRE-Elementen bei geringerem Abstand der TRE-Elemente höher ist als bei größerem Abstand der TRE-Elemente.

Beispiel 5

Rezeptor-vermittelte Induktion der TRE-Sensor-DNA

Um zeigen zu können, daß mit TPA induzierbare Sensor-DNA auch dann induziert werden kann, wenn die Zelllinie einen Rezeptor an der Oberfläche exprimiert, der über G-Proteine an das Phospholipase C-Effektor-System gekoppelt ist, und ein rezeptorspezifischer Agonist zu einem geeigneten Zeitpunkt zugegeben wird, wurden COS-7 Zellen mit TRE-Sensor-DNA und Rezeptor-DNA co-transfiziert. Die Verwendung von COS-7 Zellen und einer Rezeptor-DNA, die den SV40-Replikationsursprung enthält, ermöglichte die autonome Replikation der Rezeptor-DNA zu hohen Kopienzahlen und damit hohe Raten für die transiente Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche. Die Co-Transfektion erfolgte nach der in Beispiel 4 beschriebenen DEAE-Dextran-Methode mit dem Unterschied, daß je 5 µg TRE-Sensor-DNA und Rezeptor-DNA transfiziert wurden. In dieser Versuchsreihe wurden, nach Inkubation über Nacht und Wechseln des Mediums, in parallelen Experimenten entweder rezeptorspezifische Agonisten, oder Agonist und kompetitiver Antagonist, oder TPA als positive Kontrolle zugegeben. Als negative Kontrolle dienten

wieder nicht-induzierte Zellen. Nach 18-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und der Luciferase-Assay durchgeführt, wie in Beispiel 4 beschrieben.

a) Induktion von pADneo(3TRE)BGluci durch Bindung einer agonistisch wirkenden Substanz an den muskarinischen M3-Rezeptor

COS-7 Zellen wurden durch Zugabe von Sensor-DNA pADneo(3TRE)BGluci und von Rezeptor-DNA pCD-M3 (Buckley et al., 1989), die die Sequenz des humanen muskarinischen M3-Rezeptors im Okayama/Berg pCD Expressionsvektor (Okayama und Berg, 1983) enthält, co-transfiziert. Die Induktion erfolgte mit i) 10 ng/ml TPA (Sigma P8139), ii) 1 mM Carbachol (Sigma, C4382), iii) 1 mM Carbachol und 10 µM Atropin (Sigma A0132), und iv) 1 mM Carbachol und 20 µM Atropin. Das Ergebnis des Luciferase-Assays nach Inkubation und Lyse der Zellen ist in Fig. 24 zu sehen und zeigt, daß die Expression der Luciferase sowohl durch TPA als auch durch Carbachol, einen Agonisten für den muskarinischen Rezeptor, induziert wird. Die durch den Agonisten vermittelte Induktion wird durch gleichzeitige Zugabe des selektiven Antagonisten Atropin verhindert.

b) Induktion von pBhluc1.3, aber nicht von pADneo2-C6-BGL durch Bindung einer agonistisch wirkenden Substanz an den Serotonin-5-HT₂-Rezeptor

COS-7 Zellen wurden durch Zugabe von Sensor-DNA pBhluc1.3 und von Rezeptor-DNA pAD-CMV2-5HT₂, die die Sequenz des humanen 5HT₂-Rezeptors im Expressionsvektor pAD-CMV2 (siehe Beispiel 3) enthält, co-transfiziert. Die Induktion erfolgte mit i) 10 ng/ml Medium TPA (Sigma P8139), ii) 10 µM α -Methylserotonin-Maleat (RBI Research Biochemicals Incorporated M-110), und iii) 10 µM α -Methylserotonin-Maleat und

10 μ M Ketanserin-Tartrat (RBI S-006). Das Ergebnis des Luciferase-Assays nach Inkubation und Lyse der Zellen ist in Fig. 25A) zu sehen und zeigt, daß die Expression der Luciferase sowohl durch TPA als auch durch α -Methylserotonin-Maleat, einen Agonisten für den 5-HT₂-Rezeptor, induziert wird. Die durch den Agonisten vermittelte Induktion wird durch gleichzeitige Zugabe des selektiven Antagonisten Ketanserin-Tartrat verhindert. In einem parallelen Experiment wurden COS-7 Zellen durch Zugabe von Sensor-DNA pADneo2-C6-BGL, die 6 CRE-Elemente enthält, und von Rezeptor-DNA pAD-CMV2-5HT₂ co-transfiziert. Die Induktion erfolgte mit i) 20 μ M Forskolin (Sigma P8139), ii) 10 μ M α -Methylserotonin-Maleat (RBI M-110), und iii) 10 μ M α -Methylserotonin-Maleat und 10 μ M Ketanserin-Tartrat (RBI S-006). Das Ergebnis des Luciferase-Assays nach Inkubation und Lyse der Zellen ist in Fig. 25B) zu sehen und zeigt, daß die Expression der Luciferase zwar durch Forskolin, aber nicht durch den 5-HT₂-Rezeptor-Agonisten α -Methylserotonin-Maleat induziert wird. Aus obigen Ergebnissen folgt, daß 5-HT₂-Rezeptor-abhängig selektiv nur Regulationselemente aktiviert werden, die auf IP₃/DAG ansprechen (TRE), aber keine Regulationselemente, die auf cAMP ansprechen (CRE).

c) Induktion von pADneo2-C6-BGL, aber nicht von pBHluc1.3 durch Bindung einer agonistisch wirkenden Substanz an den Dopamin-D₁-Rezeptor

COS-7 Zellen wurden durch Zugabe von Sensor-DNA pBHluc1.3 und von Rezeptor-DNA pAD-CMV2-D₁, die die Sequenz des humanen Dopamin-D₁-Rezeptors im Expressionsvektor pAD-CMV2 (siehe Beispiel 3) enthält, co-transfiziert. Die Induktion erfolgte mit i) 10 ng/ml TPA (Sigma P8139), ii) 20 μ M Forskolin (Sigma P8139), iii) 1 μ M Apomorphin (RBI D-004), und iv)

1 μ M Apomorphin und 1 μ M SCH23390 (RBI D-054). Das Ergebnis des Luciferase-Assays nach Inkubation und Lyse der Zellen ist in Fig. 26A) zu sehen und zeigt, daß die Expression des Luciferase-Gens zwar durch TPA, aber nicht durch Apomorphin, einen Agonisten für den D1-Rezeptor, induziert wird. In einem parallelen Experiment wurden COS-7 Zellen durch Zugabe von Sensor-DNA pADneo2-C6-BGL, die 6 CRE-Elemente enthält, und von Rezeptor-DNA pAD-CMV2-D1 co-transfiziert und induziert. Das Ergebnis des Luciferase-Assays nach Inkubation und Lyse der Zellen ist in Fig. 26B) zu sehen und zeigt, daß die Expression der Luciferase sowohl durch Forskolin als auch durch Apomorphin induziert wird. Die durch den Agonisten vermittelte Induktion wird durch gleichzeitige Zugabe des selektiven Antagonisten SCH23390 verhindert. Aus obigen Ergebnissen folgt, daß der Dopamin-D1-Rezeptor selektiv nur Regulationselemente aktiviert, die auf das Adenylatzyklase-Signaltransduktionssystem ansprechen (CRE), aber keine Regulationselemente, die auf das Phospholipase C-Signaltransduktionssystem ansprechen (TRE).

Beispiel 6

a) Entwicklung von rekombinanten A549 Zelllinien, die Luciferase in Abhängigkeit von der intrazellulären IP_3 /DAG Konzentration exprimieren (TRE-Zelllinien)

Die TRE-Sensor-DNA pBHLuc1.3 hatte sich in transienten Transfektionsversuchen in der Zelllinie A549 mehr als 10fach durch Zugabe von TPA induzieren lassen. (Beispiel 4a). Zur Herstellung einer stabilen (Prä-)Test-Zelllinie für Substanzen, die durch direkte oder rezeptor-vermittelte Modulation des IP_3 /DAG-Signaltransduktionsweges die Expression des Luciferase-

Gens beeinflussen, wurden A549 Zellen gleichzeitig mit dem Plasmid pBHLuc1.3 und dem Selektionsplasmid pRSVneo durch Elektroporation wie folgt transfiziert:

Die Zellen wurden nach Entfernung des Mediums mit Hilfe einer Trypsin/PBS-Lösung von der Oberfläche gelöst, in Medium suspendiert und 5 min bei 250xg sedimentiert.

Die Zellen wurden in serumfreiem RPMI-1640 Medium (Gibco) gewaschen, wiederum abzentrifugiert und in einer Dichte von 1.25×10^7 Zellen/ml in serumfreiem RPMI-1640 resuspendiert. 0.8 ml Zellsuspension wurde mit 20 µg pBHLuc1.3 und 2 µg pRSVneo versetzt. Beide Plasmide waren zuvor mit BamHI linearisiert worden. Die Transfektion wurde mit dem PG200 Progenetor II

Elektroporationsgerät (Hoefer Scientific Instr.) mit einem einzelnen Strompuls von 270 V, 1080 µF, 1000 msec durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in RPMI-1640 Medium, versetzt mit 10% fötalem Kälberserum, verdünnt und mit einer Dichte von $2-5 \times 10^5$ Zellen pro 90 mm Kulturschale ausgesät. Vom Tag nach der Transfektion an wurden die Zellen in Selektionsmedium (RPMI-1640, angereichert mit 10% dialysiertem fötalem Kälberserum, Na-Penicillin G (100 Einheiten/ml), Streptomycin (50 Einheiten/ml) und 800 µg/ml Geneticin (G-418, Gibco-BRL)) gezüchtet.

15-20 Tage nach der Transfektion wurden einzelne Zellklone in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen überführt und weitergezüchtet. G-418 - resistente Klone wurden auf die Induzierbarkeit der Luciferaseexpression durch Zugabe von TPA getestet. Ungefähr 40000 Zellen jedes Klons wurden in 6facher Ausfertigung in 200 µl pro Vertiefung in einer lichtundurchlässigen, gewebekulturbeschichteten Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Microlite™, Dynatech Laboratories) ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Jeweils drei Ansätze wurden mit 10ng TPA/ml behandelt und

weitere 8h inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 150 µl Lyse-Puffer (25mM Tricine, 0.5 mM EDTA, 0.54 mM Natriumtripolyphosphat, 6.5 mM DTT, 16.3 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% Triton X-100, 1.2 mM ATP, 0.05 mM Luciferin; pH7.8) pro Ansatz aufgenommen und die Luciferaseaktivität in einem 96well Luminometer (ML-1000, Dynatech) gemessen.

Zellklon A20 wurde für weitere Experimente ausgewählt, weil er einen meßbaren Basiswert an Luciferaseaktivität sowie eine 15-20fache Induzierbarkeit durch TPA aufwies.

b) Entwicklung von rekombinanten A549 Test-Zelllinien, die Luciferase in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen Neurokinin 2-Rezeptors exprimieren

Dieses Beispiel zeigt die Herstellung einer Test-Zelllinie für den humanen Neurokinin 2 (NK2)-Rezeptor, der an den Phospholipase C-Signaltransduktionsweg gekoppelt ist. Diese Test-Zelllinie ermöglicht über die Messung der Luciferaseaktivität die Identifizierung von Substanzen, die rezeptorabhängig die intrazelluläre IP_3 /DAG Konzentrationen modulieren.

Die Prä-Test-Zelllinie A20 wurde, wie unter a) beschrieben, durch Elektroporation mit dem Plasmid pAHyg-NK2, das zuvor mit BglII linearisiert worden war, transfiziert. Vom Tag nach der Transfektion an wurden die Zellen in Selektionsmedium, wie für die Zelllinie A20 verwendet und zusätzlich angereichert mit 150 µg/ml Hygromycin B (Sigma), gezüchtet. Einzelklone wurden wie unter a) beschrieben auf Induzierbarkeit der Luciferaseaktivität getestet. In diesem Fall wurde jedoch Neurokinin A (1 µM, Sigma) anstelle von TPA als Induktor verwendet. Klon A20/NK2-122 zeigte in

wiederholten Experimenten eine 5-7fache Induktion der Luciferaseaktivität nach Aktivierung des Neurokinin 2-Rezeptors.

Wie in Fig. 27 gezeigt, wird in der Prä-Test-Zelllinie A20 und ebenso in der NK2-Test-Zelllinie A20/NK2-122 die Expression der Luciferase nur über den IP_3 /DAG-Signaltransduktionsweg erhöht, nicht jedoch durch Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration. Während in beiden Zelllinien die Luciferaseaktivität durch TPA dosis-abhängig bis maximal etwa 18fach induzierbar war, bewirkte Forskolin (Stimulator der Adenylatzyklase) keine Induktion der Luciferaseaktivität.

Die Kinetik der Luciferase-Induktion mittels des NK2-spezifischen Agonisten NKA GR64349 (1 μ M, Neosystem S.A.) in der Test-Zelllinie A20/NK2-122 ist in Fig. 28 gezeigt. Die maximale Luciferaseaktivierung wurde nach einer Induktionszeit von 7-8h gemessen. In der Zelllinie A20 ließ sich dagegen die Luciferaseaktivität nicht durch Zugabe des NK2-Agonisten GR64349 induzieren. Das bedeutet, daß die Prä-Test-Zelllinie A20 keine endogenen NK2-Rezeptormoleküle enthält und somit eine geeignete Kontroll-Zelllinie für die NK2-Test-Zelllinie ist.

Fig. 29A zeigt die Dosis-Wirkungskurven der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen Neurokinin 2-Rezeptors durch Neurokinine. Die relative Wirksamkeit der Neurokinine (Sigma), NKA > Neuromedin K (NMK) > Substanz P (SP), in der Zelllinie A20/NK2-122 stimmt überein mit bereits in der Literatur beschriebenen Daten aus Rezeptor-Bindungsstudien. Die Zelllinie A20 ließ sich durch keines der drei Neurokinine induzieren, das heißt, daß sie keinen der Neurokinin-Rezeptoren endogen enthält.

Die dosis-abhängige Wirkung einer Reihe von Agonisten, die für jeweils einen der drei Neurokinin-Rezeptoren spezifisch sind: NK1: GR73632 (Neosystem S.A.), BIIC 1230 ($[\beta\text{-Ala}^4, \text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}(4-11)$); NK2: GR64349 (Neosystem S.A.), BIIC 1219 ($[\beta\text{-Ala}^8] \text{NKA}(4-10)$); NK3: $[\text{MePhe}^7] \text{NMK}$ (Bachem Feinchemikalien AG), ist in Fig. 29B abgebildet.

Die agonistische Wirkung von Neurokinin A in der Zelllinie A20/NK2-122 konnte durch Zugabe von NK2-spezifischen Antagonisten (GR83074, GR87389, GR94800, Neosystem S.A.) inhibiert werden (Fig. 30). Dazu wurden die Zellen gleichzeitig mit einer konstanten Menge Neurokinin A (50 nM) und ansteigenden Mengen Antagonist behandelt. NK1-spezifische Antagonisten, (d.h. BIBO 2020 ($\pm \text{cis-3-(2-methoxybenzylamino)-2-benzhydrylquinuclidine}$), P7492 (Peninsula Lab.)) oder NK3-spezifische Antagonisten (H-9290, Bachem Feinchemikalien AG) waren hingegen erst bei höheren Konzentrationen wirksam ($\text{P7492} > \text{BIBO 2020} > \text{H-9290}$).

c) Entwicklung von A549 Zelllinien, die Luciferase in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen 5HT2-Rezeptors exprimieren

Der humane 5HT2-Rezeptor ist ebenfalls ein Beispiel eines an den Phospholipase C-Signaltransduktionsweg gekoppelten Rezeptors. Die TRE-Zelllinie A20 eignet sich daher auch in diesem Fall als Ausgangszelllinie zur Etablierung einer Test-Zelllinie zur Auffindung von Substanzen, die die Aktivität des 5HT2-Rezeptors modulieren.

Das Plasmid pAHyg-5HT2, linearisiert mit BglII, wurde dazu wie zuvor unter a) beschrieben, durch Elektroporation in die Zelllinie A20 transfiziert und in

Selektionsmedium gezüchtet. Hygromycin B-resistente Zellklone wurden auf Induzierbarkeit der Luciferaseaktivität nach Zugabe des 5HT2-spezifischen Agonisten α -Methylserotonin-Maleat (10 μ M, Research Biochemicals Inc.) getestet, und der Klon A20/5HT2-11, in dem eine 4-5fache Induktion gemessen wurde, für weitere Experimente ausgewählt.

Die Kinetik der Luciferase-Induktion mittels Serotonin (1 μ M) in der Test-Zelllinie A20/5HT2-11 ist in Fig. 31 gezeigt. Wie in Fig. 28 steigt die Luciferaseaktivität bis zu einer Induktionszeit von 6 h kontinuierlich an. Eine Induktionszeit von 6 bis 8 h ist daher ausreichend zum Testen von agonistisch bzw. antagonistisch wirkenden Substanzen. In der Zelllinie A20 ließ sich die Luciferaseaktivität nicht durch Zugabe von Serotonin induzieren. Das bedeutet, daß die Prä-Test-Zelllinie A20 keine endogenen 5HT2-Rezeptormoleküle enthält und somit eine geeignete Kontroll-Zelllinie für die 5HT2-Test-Zelllinie ist.

Fig. 32A zeigt die Dosis-Wirkungskurven der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen 5HT2-Rezeptors durch Agonisten. Wie erwartet sind die Dosis-Wirkungskurven selektiv für Serotonin und den 5HT2-Rezeptor Agonisten Serotonin-Maleat im Gegensatz zu den 5HT1A-Rezeptor Agonisten 8OH-DPAT (Research Biochemicals Inc.) und Buspirone.

Die agonistische Wirkung von Serotonin in der Zelllinie A20/5HT2-11 konnte durch Zugabe der 5HT2-spezifischen Antagonisten Spiperone bzw Mianserine (Research Biochemicals Inc.) inhibiert werden (Fig. 32B). Dazu wurden die Zellen gleichzeitig mit einer konstanten Menge Serotonin (1 μ M) und ansteigenden Mengen Antagonist behandelt.

Beispiel 7

a) Entwicklung von rekombinanten "Chinese hamster ovary (CHO)"-Zelllinien, die Luciferase in Abhängigkeit von der intrazellulären cAMP-Konzentration exprimieren (CRE-Zelllinien)

Für die Herstellung von (Prä)-Testzellen zur Untersuchung von Substanzen, die den intrazellulären cAMP Spiegel direkt oder durch Wechselwirkung mit Rezeptormolekülen indirekt beeinflussen, wurde die "Chinese hamster ovary" Zelllinie CHO-DXB11 (Urlaub und Chasin, 1980) mit der Sensor-DNA pADneo2-C6-BGL transfiziert.

Die parentale Zelllinie CHO-DXB11 wurde in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 (Gibco), supplementiert mit 10 % fötalem Rinderserum (Sebak), Hypoxanthin (100 µM), Thymidin (16 µM), Natrium-Penicillin G (100 Einheiten/ml), und Streptomycin (50 Einheiten/ml), gezüchtet. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in frischem Medium angesetzt.

Die Transfektion mittels Elektroporation wurde wie folgt durchgeführt: Die Zellen wurden nach Entfernen des Mediums mit Hilfe einer Trypsin/PBS-Lösung von der Oberfläche gelöst, in Medium suspendiert und 5 min bei 250x g pelletiert. Die Zellen wurden in HBS (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl) gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in HBS suspendiert. 0.8 ml Zellsuspension wurde mit 20 µg DNA des mit ScaI linearisierten Plasmids pADneo2-C6-BGL versetzt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die

Transfektion wurde mit dem PG200 Progenetor II Elektroporationsgerät (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) mit einem einzelnen Strompuls von 320 V, 1080 μ F, 1000 msec durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen im oben genannten Medium verdünnt, 20.000 Zellen pro 90 mm Kulturschale ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Vom Tag nach der Transfektion an wurden die Zellen mit Selektionsmedium (RPMI 1640 Medium supplementiert mit 10 % fötalem Rinderserum, Hypoxanthin (100 μ M), Thymidin (16 μ M), Natrium-Penicillin G (100 Einheiten/ml), und Streptomycin (50 Einheiten/ml), 700 μ g/ml Geneticin (G-418, Gibco-BRL) gezüchtet und im folgenden visuell auf Zellwachstum überprüft.

Sieben bis 10 Tage nach der Transfektion wurden einzelne entstandene Zellklone in Zellkultur-Platten mit 24 Vertiefungen überführt und nachfolgend weitergezüchtet. 25 isolierte G-418 resistente Zellklone wurden auf die Induzierbarkeit der Luciferaseexpression durch Aktivierung der Adenylatzyklase getestet.

Ungefähr 300.000 Zellen jedes Klons wurden in vierfacher Ausfertigung in je eine Vertiefung einer Zellkultur-Platte mit 6 Vertiefungen ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert. Jeweils zwei Ansätze wurden mit 20 μ M Forskolin behandelt und weitere 5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium von allen Zellen entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 % Triton X-100 lysiert und die Luciferaseaktivität in einem Berthold Lumat LB9501 Luminometer bestimmt (Brasier et al., 1989). Zellklon C6-13 wurde für weitere Experimente ausgewählt, weil dieser den höchsten Basiswert an Luciferaseaktivität bei gleichzeitig sehr hoher Induzierbarkeit durch

Forskolin aufwies.

Zellen der Zelllinie CHO C6-13 wurden 3 h lang mit verschiedenen Substanzen, die die intrazelluläre Konzentrationen von cAMP oder von IP_3 /DAG ändern oder eine Konzentrationsänderung vortäuschen, sowie mit Rezeptor-spezifischen Agonisten behandelt, welche die genannten Signalübertragungsmechanismen beeinflussen. Wie in Fig. 33 gezeigt, wird in der Zelllinie CHO C6-13 die Expression der Luciferase nur durch cAMP erhöhende Substanzen wie Forskolin (Stimulator der Adenylatzyklase), Dibutyryl-cAMP (membranpermeables cAMP-Derivat) und Isobutylmethylxanthin (IBMX, Phosphodiesterase-Inhibitor) erhöht. Phorbol ester PMA, Ca^{2+} -Ionophor A23187, sowie agonistische Verbindungen für Dopamin-Rezeptoren (Apomorphin, Bromocriptin), muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren (Carbachol) und Serotonin bewirkten keine signifikante Änderung der Luciferaseaktivität. Das bedeutet, daß die Luciferaseexpression in der Zelllinie CHO C6-13 nur durch die Änderung der cAMP-Konzentration moduliert wird, nicht jedoch durch die Änderung der IP_3 /DAG-Konzentration, und weiters, daß die Zellen keine biologisch nachweisbaren cAMP stimulierenden Rezeptoren vom dopaminergen, muskarinischen oder Serotonin-Typ enthalten.

Die in Fig. 34 gezeigte Dosis-Wirkungskurve der transkriptionellen Aktivierung des Luciferase-Reportergens durch Forskolin-induzierte Erhöhung der cAMP-Konzentration ergibt maximale Induktion bei 20 μ M Forskolin. Der Abfall der Luciferase-Induktion bei noch höheren Forskolinkonzentrationen dürfte auf toxische Effekte durch Forskolin selbst oder durch den überhöhten cAMP Spiegel zurückzuführen sein. Die Hemmung der Phosphodiesterase durch IBMX bewirkt einen

verminderten Abbau des gebildeten cAMP und dadurch bei gleichzeitiger Aktivierung der Adenylatzyklase erhöhte cAMP Werte. Die maximale Induktion des Luciferase-Reportergens wurde durch IBMX-Behandlung nicht signifikant beeinflusst, was bedeutet, daß die maximale Aktivierung der Transkription bereits bei einer cAMP-Konzentration, bedingt durch 20 μ M Forskolin, erreicht wird. Die Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve mit IBMX um eine Größenordnung zu geringeren Forskolinkonzentrationen zeigt deutlich die Akkumulierung von cAMP durch Hemmung des für den Abbau verantwortlichen Enzyms.

Die in Fig. 35A gezeigte Kinetik der Luciferase-Induktion in Abhängigkeit der Forskolin-Dosis ergab, daß 60 min nach Stimulation mit Forskolin eine erhöhte Luciferaseaktivität nachgewiesen werden kann. Volle Induktion der Luciferaseexpression wird nach 2.5 h erreicht und ändert sich nicht bis 4 h nach Forskolin-Stimulierung. Obwohl die absolute Höhe der Luciferase-Induktion bis 2.5 h zunimmt, bleiben die ED₅₀-Werte nahezu unbeeinflusst von der Dauer der Forskolin-Behandlung (Fig. 35B).

b) Entwicklung von rekombinanten CHO-Test-Zelllinien, die Luciferase in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen Dopamin-D1-Rezeptor exprimieren

Dieses Beispiel (wie das folgende Beispiel 8) zeigt die Herstellung von (Kontroll-)CRE-Testzellen, die auch für ein zelluläres Screeningsystem für Substanzen, die spezifische, bevorzugt humane Adenlyatzyklase-gekoppelte Rezeptoren modulieren, geeignet sind. Für die Herstellung von Rezeptor-DNA wurde die humane Dopamin-D1-Rezeptor-Sequenz verwendet.

Die zuvor charakterisierte Zelllinie CHO C6-13 wurde, wie unter a) beschrieben, durch Elektroporation mit Plasmid pAD-CMV2:D1, das zuvor mit FspI linearisiert wurde, transfektiert. Vom Tag nach der Transfektion an wurden die Zellen in Selektionsmedium für die Selektion nach Dihydrofolatreduktase (DHFR) (nukleotidfreies Medium α -MEM (Gibco), 10 % dialysiertes fötales Rinderserum (Sebak), Natrium-Penicillin G (100 Einheiten/ml), und Streptomycin (50 Einheiten/ml), 700 μ g/ml Geneticin (G-418, Gibco-BRL) gezüchtet und im folgenden visuell auf Zellwachstum überprüft. 24 einzelne isolierte Zellklone wurden, wie oben beschrieben, in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen gezüchtet und 4 h nach Behandlung mit 10 μ M Apomorphin (Agonist für den Dopaminrezeptor) auf die Zunahme der Luciferaseaktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen überprüft. Klon CHO 13D1-38 zeigte in wiederholten Experimenten die höchste Zunahme der Luciferaseaktivität nach Aktivierung des Dopamin-D1-Rezeptors.

Für die Verwendung von Testzelllinien in einem automatischen Screeningsystem mit hoher Durchsatzrate ist es von Vorteil, Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen pro Platte zu verwenden. Dazu wurden 60.000 Zellen (CHO C6-13 oder CHO 13D1-38) in 200 μ l Medium pro Vertiefung in lichtundurchlässigen, gewebekulturbeschichteten Mikrotiterplatten (MicroliteTM, Dynatech Laboratories) ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden den Zellen verschiedene Chemikalien zugesetzt und für eine bestimmte Zeitdauer (meist 3 h) inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 1 % Triton X-100 lysiert und die Luciferaseaktivität in einem 96-well Luminometer (ML-1000, Dynatech) gemessen (Fig. 36).

Die in den Fig. 37A und 37B und in Fig. 38A und 38B dargestellten Dosis-Wirkungskurven der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen Dopamin-D1-Rezeptors wurden im Mikrotiterplatten-Format erstellt und repräsentieren für jeden Datenpunkt den Mittelwert aus jeweils 4 Einzelbestimmungen; die Standardabweichung betrug ca. 15 %.

In Analogie zur Kinetik der Luciferase-Induktion mittels Forskolin in der Prätestzelllinie CHO C6-13 (Beispiel 7a)) wurde in der Dopamin-D1-Rezeptor Testzelllinie CHO 13D1-38 eine Stunde nach Stimulierung des D1-Rezeptors mit Apomorphin erhöhte Luciferaseaktivität gemessen (Fig. 37A). Die maximale Luciferase-Aktivierung wurde nach 2.5 h Stimulierung erreicht und blieb bis 4 h konstant. Der Vergleich mit der Kinetik nach direkter Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin (Fig. 35A) läßt den Schluß zu, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Transkription und Translation des Luciferase-Reportergens ist, nicht jedoch die Stimulierung der Adenylatzyklase durch den aktivierten Rezeptor.

Die geänderte Auftragung der Meßwerte zur Bestimmung der ED₅₀ Werte von Apomorphin in Fig. 37B zeigte keine signifikante Abhängigkeit der ED₅₀-Werte von der Dauer der Rezeptorstimulierung mit dem Agonisten.

Fig. 38A zeigt, daß die Induktion des Reportergens durch die Aktivierung des D1-Rezeptors mit einem Agonisten (Apomorphin) dosisabhängig mit Antagonisten verhindert werden konnte. Dazu wurden die Testzellen 24 h nach dem Aussäen in die Mikrotiterplatten mit dem Antagonisten versetzt und gleich danach eine

gleichbleibende Menge Apomorphin (1 μ M Endkonzentration) zugesetzt, die, wie in Fig. 37A gezeigt, eine maximale Induktion des Luciferase-Reportergens bewirkt. Um einen Screeningprozeß zu simulieren, bei dem die zu untersuchenden Substanzen bevorzugt in einem einheitlichen Lösungsmittel angeboten werden, wurde in diesem Versuch eine Endkonzentration von 1 % DMSO verwendet.

Die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen in diesem Testverfahren korreliert gut mit den Daten, die in der Literatur durch Rezeptor-Bindungsstudien beschrieben wurden.

Fig. 38B zeigt dieselben Werte in anderer Auftragsart (x-fache Induktion der Luciferase gegenüber identischen, unbehandelten Zellen als Kontrolle) und zusätzlich die dosisabhängige Wirkung des Agonisten Bromocryptin. Der Rückgang der Luciferase-Induktion bei der höchsten Bromocryptin-Konzentration (100 μ M) ist auf Zelltoxizität von Bromocryptin selbst oder auf den niedrigen pH-Wert zurückzuführen, der nötig war, um Bromocryptin zu lösen.

Beispiel 8

a) Entwicklung von rekombinanten "Chinese hamster ovary (CHO)"-Zelllinien, die Luciferase in Abhängigkeit von der intrazellulären cAMP-Konzentration exprimieren (CRE-Zelllinien)

Für die Herstellung von (Prä)-Testzellen zur Untersuchung von Substanzen, die den intrazellulären cAMP Spiegel direkt oder durch Wechselwirkung mit Rezeptormolekülen indirekt beeinflussen, wurde die "Chinese hamster ovary" Zelllinie CHO-DXB11 (Urlaub und

Chasin, 1980) mit der Sensor-DNA pADneo2-C12-TKL transfiziert. (Dieses Plasmid unterscheidet sich von dem in Beispiel 1) beschriebenen pADneo2-C6-BGL dadurch, daß der 6CRE-Elemente enthaltende Abschnitt verdoppelt und der β -Globin-Promotor durch den TK-Promotor (s. Beispiel 1 b)) ersetzt wurden. Dazu wurde das Sall-HindIII- β -Globin-Promotor-Fragment durch ein gleichgeschnittenes Fragment, enthaltend den TK-Promotor (McKnight, 1980), ausgetauscht.)

Die parentale Zelllinie CHO-DXB11 wurde in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 (Gibco), supplementiert mit 10 % fötalem Rinderserum (Sebak), Hypoxanthin (100 μ M), Thymidin (16 μ M), Natrium-Penicillin G (100 Einheiten/ml), und Streptomycin (50 Einheiten/ml), gezüchtet. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in frischem Medium angesetzt.

Die Transfektion und die Austestung der Zellklone wurde wie in Beispiel 7 a) vorgenommen. Zellklon C12-32 wurde für weitere Experimente ausgewählt, weil dieser den höchsten Basiswert an Luciferaseaktivität bei gleichzeitig sehr hoher Induzierbarkeit durch Forskolin aufwies.

b) Entwicklung von rekombinanten CHO-Test-Zelllinien, die Luciferase in Abhängigkeit von der Aktivierung des humanen Dopamin-D5-Rezeptor exprimieren

Dieses Beispiel (wie das vorangegangene Beispiel 7) zeigt die Herstellung von (Kontroll-)CRE-Testzellen, die auch für ein zelluläres Screeningsystem für Substanzen, die spezifische, bevorzugt humane Adenlyatzyklase-gekoppelte Rezeptoren modulieren, geeignet sind. Für die Herstellung von Rezeptor-DNA

wurde die humane Dopamin-D5-Rezeptor-Sequenz verwendet.

Die zuvor charakterisierte Zelllinie CHO C12-32 wurde, wie unter a) beschrieben, durch Elektroporation mit Plasmid pAD-CMV1:D5, das zuvor mit StuI linearisiert worden war, transfektiert. (Das Plasmid pAD-CMV1:D5 wurde hergestellt, indem das 1.6 kb große SalI-XbaI-Fragment von phD5-Gem, das die kodierende Region des humanen D5-Rezeptorgens enthält (Grandy et al., 1991), in den ebenso geschnittenen humanen Vektor pAD-CMV1 hineinligiert wurde.) Vom Tag nach der Transfektion an wurden die Zellen in Selektionsmedium für die Selektion nach Dihydrofolatreduktase (DHFR) (nukleotidfreies Medium α -MEM (Gibco), 10 % dialysiertes fötales Rinderserum (Sebak), Natrium-Penicillin G (100 Einheiten/ml), und Streptomycin (50 Einheiten/ml), 700 μ g/ml Geneticin (G-418, Gibco-BRL) gezüchtet und im folgenden visuell auf Zellwachstum überprüft. 24 einzelne isolierte Zellklone wurden, wie oben beschrieben, in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen gezüchtet und 4 h nach Behandlung mit 10 μ M Apomorphin (Agonist für den Dopaminrezeptor) auf die Zunahme der Luciferaseaktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen überprüft. Klon CHO 32D5-39 zeigte in wiederholten Experimenten die höchste Zunahme der Luciferaseaktivität nach Aktivierung des Dopamin-D5-Rezeptors.

Fig. 39B zeigt, daß die Induktion des Reportergens durch die Aktivierung des D5-Rezeptors mit einem Agonisten (Apomorphin) dosisabhängig mit Antagonisten verhindert werden konnte. Dazu wurden die Testzellen 24 h nach dem Aussäen in die Mikrotiterplatten mit dem Antagonisten versetzt und gleich danach eine gleichbleibende Menge Apomorphin (0.1 μ M

Endkonzentration) zugesetzt, die, wie in Fig. 39A gezeigt, eine maximale Induktion des Luciferase-Reportergens bewirkt. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Fig. 39B dargestellt.

Die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen in diesem Testverfahren korreliert gut mit den Daten, die in der Literatur durch Rezeptor-Bindungsstudien beschrieben wurden.

Beispiel 9

Entwicklung eines Reagens zur Messung der Luciferaseaktivität

Es wurde der Einfluß der Variation der Konzentration von ATP, Luciferin, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Dithiothreitol (DTT), β -Mercaptoethanol (BME), Natriumtripolyphosphat (NaTPP), Triton X-100 und des pH-Werts auf das erzielte Luciferase-Meßsignal ermittelt (Tabelle 2). Die übrigen Komponenten waren jeweils in den dem bevorzugten Grundpuffer gemäß Tabelle 1 entsprechenden Konzentrationen enthalten. Es wurden die 3 Minuten nach Reagenszugabe erhaltenen Meßwerte zum Vergleich herangezogen (Angabe in Prozent vom maximal erzielten Meßsignal).

Fig. 40 zeigt den Einfluß des Zusatzes von β -Mercaptoethanol und/oder Natriumtripolyphosphat zum Grundpuffer auf das Luciferase-Meßsignal (gefüllte Quadrate: Grundpuffer; offene Quadrate: Zusatz von 4 $\mu\text{l/ml}$ β -Mercaptoethanol; geschlossene Kreise: Zusatz von 0.2 mg/ml Natriumtripolyphosphat; offene Kreise: Zusatz von 4 $\mu\text{l/ml}$ β -Mercaptoethanol plus 0.2 mg/ml Natriumtripolyphosphat). Für sämtliche Versuche wurde ein Luminometer der Marke Microlite ML 1000, Fa.

Dynatech, verwendet.

Tabelle 1

Substanz	nmol/l	MG	g/l
Tricin *	25	179	4.48
EDTA	0.5	372	0.186
MgSO ₄ .7H ₂ O	16.3	246	4.0
ATP	1.2	605	0.726
Luciferin, Na-Salz	0.05	302	0.015
DTT	6.5	154	1.0
NaTTP	0.54	368	0.2

* N-tris-(Hydroxymethyl)Methyl-Glycin

Triton X-100: 1 ml/l. der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf 7.8 eingestellt.

Tabelle 2

ATP-Konz. (g/l)	3.30	1.47	0.65	0.29	0.13	0.06
% max. Signal	78	83	98	100	95	61
Luciferin-Konz. (mg/l)	15.0	10.0	6.67	4.44	2.96	1.98
% max. Signal	100	95	88	75	65	58
MgSO4-Konz. (g/l)	4.00	2.67	1.78	1.19	0.79	0.53
% max. Signal	100	100	97	77	77	64
DTT-Konz. (g/l)	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	0.0
% max. Signal	71	89	95	97	100	91
BME-Konz. (ml/l)	10.0	6.67	4.44	2.96	1.98	1.32
% max. Signal	93	94	100	86	84	68
NaTPP-Konz. (mg/l)	500	158	50.0	15.8	5.01	0.0
% max. Signal	75	100	82	64	54	49
Triton-X100 (%)	0.30	0.20	0.13	0.09	0.06	0.04
% max. Signal	82	88	92	100	99	97
pH	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0
% max. Signal	63	79	92	91	100	88
						8.2
						59
						8.4
						65

ERSATZBLATT

Literatur:

- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H.,
Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P., 1987a, Mol.
Cell. Biol. 7, 2256-2266
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra,
R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, L., Herrlich, P. und
Karin, M., 1987b, Cell 49, 729-739
- Billah, M.M., Pai, J.-K., Mullmann, T.J. Egan, R.W. und
Siegel, 1989, J. Biol. Chem. 264, 9069-9076.
- Brasier, A.R., Tate, J.E. und Habener, J.F. 1989,
BioTechniques 7, 1116-1122
- Buckley, N.J. et al., 1989, Molecular Pharmacology 35,
469-476
- Chung, C.T. und Miller, R.H., 1988, Nucl. Acids Res.
16, 3580
- Deutsch, P.J., Hoeffler, J.P., Jameson, J.L. und
Habener, J.F., 1988, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85,
7922-7926
- DeLuca, M., Wannlund, J. und McElroy, W.D., 1979, Anal.
Biochem. 95, 194-198
- De Wet, J.R., Wood, K.V., Helinski, D.R., und DeLuca,
M., 1985, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82, 7870-7873
- De Wet, J.R., Wood, K., DeLuca, M., Helinski, D. und
Subramani, S., 1987, Mol. Cell. Biol. 7, 725-737
- Dohlman, H.G. et al., 1991, Ann. Rev. Biochem. 60, 653-
688
- Doods, N.H. und von Meel, J.C.A., 1991, Receptor Data
for Biological Experiments, Ellis Horwood Series
in Pharmacological Sciences
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R.,
Chan, H. N., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold,
G. M., und Danielsen, M., 1987,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84, 7413-7417.
- Grandy, D.K., Zhang, Y., Bouvier, C., Zhou, Q.Y. et
al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9175-

9179

- Gritz, L. und Davies, J., 1983, *Gene* 25, 179-188
- Hartmann, A., 1991, *BioTec* 5, 40-45
- Houslay, M.D., 1991, *Eur. J. Biochem.* 195, 9-27
- Julius, D., Huang, K.N., Livelli, T.J. Axel, R. und Jessell, T.M., 1990, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87, 928-932
- Karin, M., 1989, *TIG* 5, 65-67
- King, K., Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G. und Lefkowitz, R.J., 1990, *Science* 250, 121-123
- Kricka, L.J., 1988, *Analyt. Biochem.* 175, 14-21
- Leach, F.R. und Webster, J.J., 1986, in: *Bioluminescence and Chemiluminescence, Part B, Methods in Enzymology* 133, 51-70
- Lee, W., Mitchell, P. und Tjian, R., 1987, *Cell* 49, 741-752
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. und McKnight, S.L., 1988, *Science* 240, 1759-1764
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J., 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbour Laboratory
- McKnight, S.L., 1980, *Nucleic Acids Res.* 8, 5949-5964
- Montmayeur, J.-P. und Borrelli, E., 1991, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88, 3135-3139
- Montminy, M.R., Gonzalez, G.A. und Yamamoto, K.K., 1990, *Trends Neurosci.* 13, 185
- Mulligan, R. und Berg, P., 1981, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78, 2072-2076
- Okayama, H. und Berg, P., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3, 280-289
- Potter, H., Weir, L., und Leder, P., 1984, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 81, 7161.
- Pritchett et al., 1988, *EMBO Journal* 7, 4135-4140
- Probst, W.C., Snyder L.A., Schuster D.I., Brosius J. und Sealton S.C., 1992, *DNA and Cell Biol.* 11, 1-20

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J.,
Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich,
H.A., 1988, Science 239, 487-491
- Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J. und Verma, I.M., 1990,
Oncogene 5, 427-431
- Short, et al., 1988, Nucl. Acids Res. 11, 5521-5540
- Simon M.I., Strathmann, M.P. und Gautam, N., 1991,
Science 252, 802-808
- Southern, P. und Berg, P., 1982, J. Mol. Appl. Gen. 1,
327
- Stinski, M.F. und Roehr, T.J., 1985, J. Virology 55,
431-441
- Subramani, S. und DeLuca, M., 1987, Genetic
Engineering, Principles and Methods, J.K. Sedlow
ed., Plenum Press, New York, Band 10, 75-89
- Sugden, B., Marsh, K. und Yates, J., 1985, Mol. Cell.
Biol. 5, 410-413
- Tanahashi, H., Ito, T., Inouye, S., Tsuji, F.I.,
Sakaki, Y., 1990, Gene 96, 249-255
- Turner R. und Tjian, R., 1989, Science 243, 1689-1694
- Ullrich, A. und Schlessinger, J., 1990, Cell 61, 203-
212
- Urlaub, G. und Chasin, L.A., 1980, Proc.Natl.Acad.Sci.
USA 77, 4216-4220
- Voraberger, G., et al., 1991, J. Immunol. 147, 2777
- Wagner, M.J., Sharp, J.A. und Summers, W.C., 1981,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 78, 1441-1445
- Wieland, E. et al., 1985, Ärztl. Lab. 31, 203-214
- Winnacker, E.L., 1985, Gene und Klone, Eine Einführung
in die Gentechnologie, VCH Verlagsges. Weinheim,
264
- Zhou, Q.-Y., Grandy, D.K., Thambi, L., Kushner, J.A.,
Van Tol, H.H.M., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J.,
Bunzow, J.R., und Civelli, O., 1990, Nature 347,
76-80
- Cloning Vectors: Chapter VIII, Hsg. Pouwels, Enger-

Valk, Brammer, Elsevier, Amsterdam, New York,
Oxford, 1985

Human Pharmacology - Molecular-To-Clinical, Chapter 2:
Sites of Action: Receptors, Hsg. Wingard., L.B.,
Brody, T.M., Larner, J. und Schwartz, A., Mosby
Year-Book Inc., St.Louis, 1991

TiPS: Receptor Nomenclature Supplement, 1991

SEQUENZPROTOKOLL

(1) TITEL DER ERFINDUNG: Verfahren zum Screenen von Substanzen mit modulierender Wirkung auf einen rezeptorabhängigen zellulären Signalübertragungsweg

ANZAHL DER SEQUENZEN: 37

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 1630 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

CGTATCGATA GCATGTCTGA TCAGACAGCA GCTGCGCAGG GCTCGGAATG CTACCCTAAA	60
AGGCCACTCG AAACCCAGC CCCGGGAGAA CAGCATGTAC ACCAGCCTCA GTGTTACAGA	120
GTGTGGGTAC ATCAAGGTGA ATGGTGAGCA GAAACTATAA CCTGTTAGTC CTTCTACACC	180
TCATCTGCTA CAAGTTCTGG CTTAGAC ATG GAT ATT CTT TGT GAA GAA AAT	231
Met Asp Ile Leu Cys Glu Glu Asn	
1 5	
ACT TCT TTG AGC TCA ACT ACG AAC TCC CTA ATG CAA TTA AAT GAT GAC	279
Thr Ser Leu Ser Ser Thr Thr Asn Ser Leu Met Gln Leu Asn Asp Asp	
10 15 20	
ACC AGG CTC TAC AGT AAT GAC TTT AAC TCC GGA GAA GCT AAC ACT TCT	327
Thr Arg Leu Tyr Ser Asn Asp Phe Asn Ser Gly Glu Ala Asn Thr Ser	
25 30 35 40	

GAT GCA TTT AAC TGG ACA GTC GAC TCT GAA AAT CGA ACC AAC CTT TCC Asp Ala Phe Asn Trp Thr Val Asp Ser Glu Asn Arg Thr Asn Leu Ser 45 50 55	375
TGT GAA GGG TGC CTC TCA CCG TCG TGT CTC TCC TTA CTT CAT CTC CAG Cys Glu Gly Cys Leu Ser Pro Ser Cys Leu Ser Leu Leu His Leu Gln 60 65 70	423
GAA AAA AAC TGG TCT GCT TTA CTG ACA GCC GTA GTG ATT ATT CTA ACT Glu Lys Asn Trp Ser Ala Leu Leu Thr Ala Val Val Ile Ile Leu Thr 75 80 85	471
ATT GCT GGA AAC ATA CTC GTC ATC ATG GCA GTG TCC CTA GAG AAA AAG Ile Ala Gly Asn Ile Leu Val Ile Met Ala Val Ser Leu Glu Lys Lys 90 95 100	519
CTG CAG AAT GCC ACC AAC TAT TTC CTG ATG TCA CTT GCC ATA GCT GAT Leu Gln Asn Ala Thr Asn Tyr Phe Leu Met Ser Leu Ala Ile Ala Asp 105 110 115 120	567
ATG CTG CTG GGT TTC CTT GTC ATG CCC GTG TCC ATG TTA ACC ATC CTG Met Leu Leu Gly Phe Leu Val Met Pro Val Ser Met Leu Thr Ile Leu 125 130 135	615
TAT GGG TAC CGG TGG CCT CTG CCG AGC AAG CTT TGT GCA GTC TGG ATT Tyr Gly Tyr Arg Trp Pro Leu Pro Ser Lys Leu Cys Ala Val Trp Ile 140 145 150	663
TAC CTG GAC GTG CTC TTC TCC ACG GCC TCC ATC ATG CAC CTC TGC GCC Tyr Leu Asp Val Leu Phe Ser Thr Ala Ser Ile Met His Leu Cys Ala 155 160 165	711
ATC TCG CTG GAC CGC TAC GTC GCC ATC CAG AAT CCC ATC CAC CAC AGC Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Val Ala Ile Gln Asn Pro Ile His His Ser 170 175 180	759
CGC TTC AAC TCC AGA ACT AAG GCA TTT CTG AAA ATC ATT GCT GTT TGG Arg Phe Asn Ser Arg Thr Lys Ala Phe Leu Lys Ile Ile Ala Val Trp 185 190 195 200	807
ACC ATA TCA GTA GGT ATA TCC ATG CCA ATA CCA CTC TTT GGG CTA CAG	855

Thr Ile Ser Val Gly Ile Ser Met Pro Ile Pro Val Phe Gly Leu Gln	
205 210 215	
GAC GAT TCG AAG GTC TTT AAG GAG GGG AGT TGC TTA CTC GCC GAT GAT	903
Asp Asp Ser Lys Val Phe Lys Glu Gly Ser Cys Leu Leu Ala Asp Asp	
220 225 230	
AAC TTT GTC CTG ATC GGC TCT TTT GTG TCA TTT TTC ATT CCC TTA ACC	951
Asn Phe Val Leu Ile Gly Ser Phe Val Ser Phe Phe Ile Pro Leu Thr	
235 240 245	
ATC ATG GTG ATC ACC TAC TTT CTA ACT ATC AAG TCA CTC CAG AAA GAA	999
Ile Met Val Ile Thr Tyr Phe Leu Thr Ile Lys Ser Leu Gln Lys Glu	
250 255 260	
GCT ACT TTG TGT GTA AGC GAT CTT GGC ACA CGG GCC AAA TTA GCT TCT	1047
Ala Thr Leu Cys Val Ser Asp Leu Gly Thr Arg Ala Lys Leu Ala Ser	
265 270 275 280	
TTC AGC TTC CTC CCT CAG AGT TCT TTG TCT TCA GAA AAG CTC TTC CAG	1095
Phe Ser Phe Leu Pro Gln Ser Ser Leu Ser Ser Glu Lys Leu Phe Gln	
285 290 295	
CGG TCG ATC CAT AGG GAG CCT GGG TCC TAC ACA GGC AGG AGG ACT ATG	1143
Arg Ser Ile His Arg Glu Pro Gly Ser Tyr Thr Gly Arg Arg Thr Met	
300 305 310	
CAG TCC ATC AGC AAT GAG CAA AAG GCA TGC AAG GTG CTG GGC ATC GTC	1191
Gln Ser Ile Ser Asn Glu Gln Lys Ala Cys Lys Val Leu Gly Ile Val	
315 320 325	
TTC TTC CTG TTT GTG GTG ATG TGG TGC CCT TTC TTC ATC ACA AAC ATC	1239
Phe Phe Leu Phe Val Val Met Trp Cys Pro Phe Phe Ile Thr Asn Ile	
330 335 340	
ATG GCC GTC ATC TGC AAA GAG TCC TGC AAT GAG GAT GTC ATT GGG GCC	1287
Met Ala Val Ile Cys Lys Glu Ser Cys Asn Glu Asp Val Ile Gly Ala	
345 350 355 360	
CTG CTC AAT GTG TTT GTT TGG ATC GGT TAT CTC TCT TCA GCA GTC AAC	1335
Leu Leu Asn Val Phe Val Trp Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Ala Val Asn	

	365	370	375	
CCA CTA GTC TAC ACA CTG TTC AAC AAG ACC TAT AGG TCA GCC TTT TCA				1383
Pro Leu Val Tyr Thr Leu Phe Asn Lys Thr Tyr Arg Ser Ala Phe Ser				
	380	385	390	
CGG TAT ATT CAG TGT CAG TAC AAG GAA AAC AAA AAA CCA TTG CAG TTA				1431
Arg Tyr Ile Gln Cys Gln Tyr Lys Glu Asn Lys Lys Pro Leu Gln Leu				
	395	400	405	
ATT TTA GTG AAC ACA ATA CCG GCT TTG GCC TAC AAG TCT AGC CAA CTT				1479
Ile Leu Val Asn Thr Ile Pro Ala Leu Ala Tyr Lys Ser Ser Gln Leu				
	410	415	420	
CAA ATG GGA CAA AAA AAG AAT TCA AAG CAA GAT GCC AAG ACA ACA GAT				1527
Gln Met Gly Gln Lys Lys Asn Ser Lys Gln Asp Ala Lys Thr Thr Asp				
	425	430	435	440
AAT GAC TGC TCA ATG GTT GCT CTA GGA AAG CAG CAT TCT GAA GAG GCT				1575
Asn Asp Cys Ser Met Val Ala Leu Gly Lys Gln His Ser Glu Glu Ala				
	445	450	455	
TCT AAA GAC AAT AGC GAC GGA GTG AAT GAA AAG GTG AGC TGT GTG TGATAGGCTA				1630
Ser Lys Asp Asn Ser Asp Gly Val Asn Glu Lys Val Ser Cys Val				
	460	465	470	

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 471 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

Met	Asp	Ile	Leu	Cys	Glu	Glu	Asn	Thr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Thr	Asn
1															
				5						10					15

Ser Leu Met Gln Leu Asn Asp Asp Thr Arg Leu Tyr Ser Asn Asp Phe
 20 25 30

Asn Ser Gly Glu Ala Asn Thr Ser Asp Ala Phe Asn Trp Thr Val Asp
 35 40 45

Ser Glu Asn Arg Thr Asn Leu Ser Cys Glu Gly Cys Leu Ser Pro Ser
 50 55 60

Cys Leu Ser Leu Leu His Leu Gln Glu Lys Asn Trp Ser Ala Leu Leu
 65 70 75 80

Thr Ala Val Val Ile Ile Leu Thr Ile Ala Gly Asn Ile Leu Val Ile
 85 90 95

Met Ala Val Ser Leu Glu Lys Lys Leu Gln Asn Ala Thr Asn Tyr Phe
 100 105 110

Leu Met Ser Leu Ala Ile Ala Asp Met Leu Leu Gly Phe Leu Val Met
 115 120 125

Pro Val Ser Met Leu Thr Ile Leu Tyr Gly Tyr Arg Trp Pro Leu Pro
 130 135 140

Ser Lys Leu Cys Ala Val Trp Ile Tyr Leu Asp Val Leu Phe Ser Thr
 145 150 155 160

Ala Ser Ile Met His Leu Cys Ala Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Val Ala
 165 170 175

Ile Gln Asn Pro Ile His His Ser Arg Phe Asn Ser Arg Thr Lys Ala
 180 185 190

Phe Leu Lys Ile Ile Ala Val Trp Thr Ile Ser Val Gly Ile Ser Met
 195 200 205

Pro Ile Pro Val Phe Gly Leu Gln Asp Asp Ser Lys Val Phe Lys Glu
 210 215 220

Gly Ser Cys Leu Leu Ala Asp Asp Asn Phe Val Leu Ile Gly Ser Phe
 225 230 235 240

Val Ser Phe Phe Ile Pro Leu Thr Ile Met Val Ile Thr Tyr Phe Leu
 245 250 255
 Thr Ile Lys Ser Leu Gln Lys Glu Ala Thr Leu Cys Val Ser Asp Leu
 260 265 270
 Gly Thr Arg Ala Lys Leu Ala Ser Phe Ser Phe Leu Pro Gln Ser Ser
 275 280 285
 Leu Ser Ser Glu Lys Leu Phe Gln Arg Ser Ile His Arg Glu Pro Gly
 290 295 300
 Ser Tyr Thr Gly Arg Arg Thr Met Gln Ser Ile Ser Asn Glu Gln Lys
 305 310 315 320
 Ala Cys Lys Val Leu Gly Ile Val Phe Phe Leu Phe Val Val Met Trp
 325 330 335
 Cys Pro Phe Phe Ile Thr Asn Ile Met Ala Val Ile Cys Lys Glu Ser
 340 345 350
 Cys Asn Glu Asp Val Ile Gly Ala Leu Leu Asn Val Phe Val Trp Ile
 355 360 365
 Gly Tyr Leu Ser Ser Ala Val Asn Pro Leu Val Tyr Thr Leu Phe Asn
 370 375 380
 Lys Thr Tyr Arg Ser Ala Phe Ser Arg Tyr Ile Gln Cys Gln Tyr Lys
 385 390 395 400
 Glu Asn Lys Lys Pro Leu Gln Leu Ile Leu Val Asn Thr Ile Pro Ala
 405 410 415
 Leu Ala Tyr Lys Ser Ser Gln Leu Gln Met Gly Gln Lys Lys Asn Ser
 420 425 430
 Lys Gln Asp Ala Lys Thr Thr Asp Asn Asp Cys Ser Met Val Ala Leu
 435 440 445
 Gly Lys Gln His Ser Glu Glu Ala Ser Lys Asp Asn Ser Asp Gly Val

450	455	460
Asn	Glu	Lys
465	470	Val

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(1) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- ```
(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
```

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

```
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:
```

GGATTTCGGC CCTGTAGCC GCG

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(1) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare  
(B) TYP: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(14) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

CACTGAACTC GAGCAGCTGC GTTGCTGGCG TTTTTC

37

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:5:

(1) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 64 Basenpaare  
(B) TYP: Nukleinsäure

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

GACTTCAGAT CTGCGGCCGC CTCGAGGGTA CCGTTAACGT CGACAAACCC CGCCCAGCGT 60

CTTG 64

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

GACTTCGGAT CCGAGCTCAC TAGTTCTAGA AAGCTTGACG CTGTTAAGCG GGTCGC 56

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

GACTTCGGAT CCGAGCTCAC TAGTTCTAGA AAGCTTGACG CTGTTAAGCG GGTCGC 56

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:8:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

AGCTTGTAAG CAGCAGCTGC ACTGCTCTGC CTTTATGCC CAAGG

45

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:9:

## (i) SEQUENZBESCHREIBUNG:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

TCGATGCGGC CGCGACTTCA G

21

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:10:

## (i) SEQUENZBESCHREIBUNG:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

CTGAAGTCGC GGCCGCA

17

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

GGCAGCTGAC GTCAGTGTCT GGTGC

25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

CTCCTTGGCT GACGTCAGTA GAGAGATCCC ATGGC

35

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

CTCTACTGAC GTCAGCCAAG GAGGTAC

27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

(A) LÄNGE: 47 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

CGTCATACTG TGACGTCTTT CAGACACCCC ATTGACGTCA ATGGGAG

47

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

(A) LÄNGE: 41 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

GGCCGCACCA GACAGTGACG TCAGCTGCCA GATCCCATGG C

41

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:16:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

CTCCTTGGCT GACGTCAGTA GAGAGATCCC ATGGC

35

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:17:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 63 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

TCGACTCCCA TTGACGTCAA TGGGGTGTCT GAAAGACGTC ACAGTATGAC GGCCATGGGA

60

TCT

63

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:18:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

GGCCGCAGGT ACCAGATCTA CTCGAGTGTA GACCGTGATT CAAGCTTAGC TG TAGAC

57

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:19:

GCTTGAATCA CGGTCTACAC TCGAGTAGAT CTGGTACCTG C

41

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:20:

TCGACTAAGC TTGAATCAGC GTCTACAGCT AAGCTTGAAT CACGGTCTAC AGCTAA

56

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:21:

CGTGATTCAA GCTTAGCTGT AGACCGTGAT TCAAGCTTAG

40

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:22:

GGCCGCAGGT ACCAGATCTA CTCGAGTGTA GACCGTGATT CAAGCTTAGT GTAGAC

56

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:23:

TCGACCTTGA ATCACGGTCT AACTAAGCT TGAATCACGG TCTACACTAA

50

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:24:

CGTGATTCAA GCTTAGTGTA GACCGTGATT CAAGG

35

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:25:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:
  - (A) LÄNGE: 53 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:25:

GGCCGCAGGT ACCAGATCTA CTCGAGTGTA GACCGTGATT CAAGCTTAGC CTG

53

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:26:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:
  - (A) LÄNGE: 64 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:26:

TCGACTAAGC TTGAATCAGG GTCTACACCA GGCTAAGCTT GAATCACGGT CTACACCAGG

60

CTAA

64

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:27:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 52 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:27:

GTGTAGACCG TGATTCAAGC TTAGCCTGGT GTAGACCGTG ATTCAAGCTT AG

52

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:28:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 64 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:28:

GGCCGCAGGT ACCAGATCTA CTCGAGTGTA GACCGTGATT CAAGCTTAGC CTGGCGGTGT

60

AGAC

64

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:29:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:29:

CCAGGCTAAG CTTGAATCAC GGTCTACACT CGAGTAGATC TGGTACCTGC

50

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:30:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

(A) LÄNGE: 51 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:30:

CGTGATTCAA GCTTAGCCTG GCGGTGTAGA CCGTGATTCA AGCTTAGCCT G

51

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:31:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

(A) LÄNGE: 65 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:31:

TCGACAGGCT AAGCTTGAAT CACGGTCTAC ACCGCCAGGC TAAGCTTGAA TCACGGTCTA

60

CACCG

65

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:32:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:32:

GGCCGCAGGT ACCAGATCTA CTCGAGTSTA GACCGTGATT CAAGCTTAGC CTGGCCGGTT 60

AGCGCGGTGT AGAC 74

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:33:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:33:

CGCGCTAACC GGCCAGGCTA AGCTTGAATC ACGGTCTACA CTCGAGTAGA TCTGGTACCT 60

GC 62

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:34:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 73 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:34:

TCGACAGGCT AAGCTTGAAT CACGGTCTAC ACCGCGCTAA CCGGCCAGGC TAAGCTTGAA 60  
TCACGGTCTA CAC 73

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:35:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 61 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:35:

CGTGATTCAA GCTTAGCCTG GCCGGTTAGC GCGGTGTAGA CCGTGATTCA AGCTTAGCCT 60  
G 61

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:36:

(i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 6623 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Plasmid-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:36:

AATCAATATT GGCAATTAGC CATATTAGTC ATTGGTTATA TAGCATGAAT CAATATTGGC 60

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| TATTGGCCAT TGCATACGTT GTATCTATAT CATAATATGT ACATTTATAT TGGCTCATGT | 120  |
| CCAATATGAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG | 180  |
| GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC | 240  |
| CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCCCG CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC | 300  |
| ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT | 360  |
| GCCCCACTTG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT | 420  |
| GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT | 480  |
| TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC | 540  |
| ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTC CAAGTCTCCA CCCCATTGAC | 600  |
| GTCAATGGGA GTTTGTTTTG GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC | 660  |
| TCCGCCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA | 720  |
| GCTCTCTGGC TAACTAGAGA ACCCACTGCT TACTGGCTTA TCGAAATTAA TACGACTCAC | 780  |
| TATAGGGAGA CCCAAGCTTC TGCAGGTCGA CATCGATGGA TCCGGTACCT CGAGCGGCCG | 840  |
| CGAATTCTCT AGAGGATCTT TGTGAAGGAA CCTTACTTCT GTGGTGTGAC ATAATTGGAC | 900  |
| AAACTACCTA CAGAGATTTA AAGCTCTAAG GTAAATATAA AATTTTAAAG TGTATAATGT | 960  |
| GTTAAACTAC TGATTCTAAT TGTTTGTGTA TTTTAGATTG CAACCTATGG AACTGATGAA | 1020 |
| TGGGAGCAGT GGTGGAATGC CTTTAATGAG GAAACCTGT TTTGCTCAGA AGAAATGCCA  | 1080 |
| TCTAGTGATG ATGAGGCTAC TGCTGACTCT CAACATTCTA CTCCTCCAAA AAAGAAGAGA | 1140 |
| AAGGTAGAAG ACCCCAAGGA CTTTCCTTCA GAATTGCTAA GTTTTTTGAG TCATGCTGTG | 1200 |
| TTTAGTAATA GAACTCTTGC TTGCTTTGCT ATTTACACCA CAAAGGAAAA AGCTGCACTG | 1260 |
| CTATACAAGA AAATTATGGA AAAATATTG ATGTATAGTG CCTTGACTAG AGATCATAAT  | 1320 |
| CAGCCATACC ACATTTGTAG AGGTTTTACT TGCTTTAAAA AACCTCCAC ACCTCCCCCT  | 1380 |
| GAACCTGAAA CATAAAATGA ATGCAATTGT TGTTGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA | 1440 |
| TGGTTACAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCCTGCA  | 1500 |
| TTCTAGTTGT GGTGTGTCCA AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA TCAATTCTGA | 1560 |



|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| TGATAGAGTT GGTCAAGACC AATGCGGAGC ATATACGCCC GGAGCCGCGG CGATCCTGCA  | 3120 |
| AGCTCCGGAT GCCTCCGCTC GAAGTAGCGC GTCTGCTGCT CCATACAAGC CAACCACGGC  | 3180 |
| CTCCAGAAGA AGATGTTGGC GACCTCGTAT TGGGAATCCC CGAACATCGC CTCGCTCCAG  | 3240 |
| TCAATGACCG CTGTTATGCG GCCATTGTCC GTCAGGAGAT TGTGGAGCC GAAATCCGGC   | 3300 |
| TGCACGAGGT GCCGGACTTC GGGGCACTCC TCGGCCCCAA GCATCAGCTC ATCGAGAGCC  | 3360 |
| TGCGCCACGG ACGCACTGAC GGTGTCGTCC ATCACAGTTT GCCAGTGATA CACATGGGGA  | 3420 |
| TCAGCAATCG CGCATATGAA ATCACGCCAT GTAGTGATT GACCGATTCC TTGCGGTCCG   | 3480 |
| AATGGGCCGA ACCCGCTCGT CTGGCTAAGA TCGGCCGCAG CGATCGCATC CATGGCCTCC  | 3540 |
| GGGACCGGCT GCACAACAGC GGGCAGTTCG GTTTCAGGCA GGTCTTGCAA CGTGACACCC  | 3600 |
| TGTGCACGGC GGGAGATGCA ATAGGTCAGG CTCTCGCTGA ATTCCCCAAT GTCAAGCACT  | 3660 |
| TCCGGAATCG GGAGCGCGGC CGATGCAAAG TGCCGATAAA CATAACGATC TTTGTAGAAA  | 3720 |
| CCATCGGCGC AGCTATTTAC CCGCAGGACA TATCCACGCC CTCCTACATC GAAGCTGAAA  | 3780 |
| GCACGAGATT CTTGCCCCTC CGAGAGCTGC ATCAGGTCGG AGACGCTGTC GAACTTTTCG  | 3840 |
| ATCAGAACT TCTCGACAGA CGTCGCGGTG AGTTCAGGCT TTTTCATATC TCATTGCCCC   | 3900 |
| CGGACGAGGA TCTGCGGCAC GCTGTTGACG CTGTTAAGCG GGTGCTGCA GGGTCGCTCG   | 3960 |
| GTGTTGAGG CCACACGCGT CACCTTAATA TGCGAAGTGG ACCTGGGACC GCGCCGCCCC   | 4020 |
| GACTGCATCT GCGTGTTGCA ATTGCGCAAT GACAAGACGC TGGGCGGGGT TTGTGTCATC  | 4080 |
| ATAGAACTAA AGACATGCAA ATATATTTCT TCCGGGGACA CCGCCAGCAA ACGCGAGCAA  | 4140 |
| CGGGCCACGG GGATGAAGCA GGGCGGCACC TCGCTAACGG ATTCACCACT CCAAGAATTG  | 4200 |
| GAGCCAATCA ATTCTTGCGG AGAACTGTGA ATGCGCAAAC CAACCCCTTG CAGAACATAT  | 4260 |
| CCATCGCGTC CGCCATCTCC AGCAGCCGCA CGCGGCGCAT CTCGGGCAGC GTTGGGTCCCT | 4320 |
| GGCCACGGGT GCGCATGATC GTGCTCCTGT CGTTGAGGAC CCGGCTAGGC TGGCGGGGTT  | 4380 |
| GCCTTACTGG TTAGCAGAAT GAATCACCGA TACGCGAGCG AACGTGAAGC GACTGCTGCT  | 4440 |
| GCAAAACGTC TCGACCTGA GCAACAACAT GAATGCTCTT CGGTTTCCGT GTTTCGTAAA   | 4500 |
| GTCTGGAAAC GCGGAAGTCA GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG  | 4560 |

|             |            |            |             |            |             |      |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| GTCGTTCCGGC | TGCGGCGAGC | GGTATCAGCT | CACTCAAAGG  | CGGTAATACG | GTTATCCACA  | 4620 |
| GAATCAGGGG  | ATAACGCAGG | AAAGAACATG | TGAGCAAAAG  | GCCAGCAAAA | GGCCAGGAAC  | 4680 |
| CGTAAAAAGG  | CCGCGTTGCT | GGCGTTTTTC | CATAGGCTCC  | GCCCCCTGA  | CGAGCATCAC  | 4740 |
| AAAAATCGAC  | GCTCAAGTCA | GAGGTGGCGA | AACCCGACAG  | GACTATAAAG | ATACCAGGCG  | 4800 |
| TTTCCCCCTG  | GAAGCTCCCT | CGTGCGCTCT | CCTGTTCCGA  | CCCTGCCGCT | TACCGGATAC  | 4860 |
| CTGTCCGCCT  | TTCTCCCTTC | GGGAAGCGTG | GCGCTTTCTC  | ATAGCTCACG | CTGTAGGTAT  | 4920 |
| CTCAGTTCGG  | TGTAGTTCGT | TCGCTCCAAG | CTGGGCTGTG  | TGCACGAACC | CCCCGTTTACG | 4980 |
| CCCGACCGCT  | GCGCCTTATC | CGGTAACAT  | CGTCTTGAGT  | CCAACCCGGT | AAGACACGAC  | 5040 |
| TTATCGCCAC  | TGGCAGCAGC | CACTGGTAAC | AGGATTAGCA  | GAGCGAGGTA | TGTAGGCGGT  | 5100 |
| GCTACAGAGT  | TCTTGAAGTG | GTGGCCTAAC | TACGGCTACA  | CTAGAAGGAC | AGTATTTGGT  | 5160 |
| ATCTGCGCTC  | TGCTGAAGCC | AGTTACCTTC | GGAAAAAGAG  | TTGGTAGCTC | TTGATCCGGC  | 5220 |
| AAACAAACCA  | CCGCTGGTAG | CGGTGGTTTT | TTTGTGTTGCA | AGCAGCAGAT | TACGCGCAGA  | 5280 |
| AAAAAAGGAT  | CTCAAGAAGA | TCCTTTGATC | TTTTCTACGG  | GGTCTGACGC | TCAGTGGAAC  | 5340 |
| GAAAACTCAC  | GTTAAGGGAT | TTTGGTCATG | AGATTATCAA  | AAAGGATCTT | CACCTAGATC  | 5400 |
| CTTTTAAATT  | AAAAATGAAG | TTTTAAATCA | ATCTAAAGTA  | TATATGAGTA | AACTTGGTCT  | 5460 |
| GACAGTTACC  | AATGCTTAAT | CAGTGAGGCA | CCTATCTCAG  | CGATCTGTCT | ATTTGTTTCA  | 5520 |
| TCCATAGTTG  | CCTGACTCCC | CGTCGTGTAG | ATAACTACGA  | TACGGGAGGG | CTTACCATCT  | 5580 |
| GGCCCCAGTG  | CTGCAATGAT | ACCGCGAGAC | CCACGCTCAC  | CGGCTCCAGA | TTTATCAGCA  | 5640 |
| ATAAACCAGC  | CAGCCGGAAG | GGCCGAGCGC | AGAAGTGGTC  | CTGCAACTTT | ATCCGCCTCC  | 5700 |
| ATCCAGTCTA  | TTAATTGTTG | CCGGGAAGCT | AGAGTAAGTA  | GTTCGCCAGT | TAATAGTTTG  | 5760 |
| CGCAACGTTG  | TTGCCATTGC | TGCAGGCATC | GTGGTGTAC   | GCTCGTCGTT | TGTTATGGCT  | 5820 |
| TCATTAGCT   | CCGGTTCCCA | ACGATCAAGG | CGAGTTACAT  | GATCCCCCAT | GTTGTGCAAA  | 5880 |
| AAAGCGGTGA  | GCTCCTTCGG | TCCTCCGATC | GTTGTCAGAA  | GTAAGTTGGC | CGCAGTGTTA  | 5940 |
| TCACTCATGG  | TTATGGCAGC | ACTGCATAAT | TCTCTTACTG  | TCATGCCATC | CGTAAGATGC  | 6000 |
| TTTTCTGTGA  | CTGGTGAGTA | CTCAACCAAG | TCATTCTGAG  | AATAGTGTAT | GCGGCGACCG  | 6060 |

```

AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA 6120
GTGCTCATCA TTGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAACTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG 6180
AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC 6240
ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG 6300
GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT 6360
CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA 6420
GGGGTTCCGC GCACATTTC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC 6480
ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTCTCA 6540
TGTTTGACAG CTTATCGATC CGGCCAACGG TGTGCCATT GCTGCAGGCG CAGAGCTGGT 6600
AGGTATGGAA GATCTATACA GTG 6623

```

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:37:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISIERUNG:

- (A) LÄNGE: 6630 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: zirkulär

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Plasmid-DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:37:

```

AATCAATATT GGCAATTAGC CATATTAGTC ATTGGTTATA TAGCATGAAT CAATATTGGC 60
TATTGGCCAT TGCATACGTT GTATCTATAT CATAATATGT ACATTTATAT TGGCTCATGT 120
CCAATATGAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG 180
GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC 240
CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC 300
ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAACT 360
GCCCCTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT 420

```

|             |            |            |            |            |            |      |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| GACGGTAAAT  | GGCCCGCCTG | GCATTATGCC | CAGTACATGA | CCTTATGGGA | CTTTCCTACT | 480  |
| TGGCAGTACA  | TCTACGTATT | AGTCATCGCT | ATTACCATGG | TGATGCGGTT | TTGGCAGTAC | 540  |
| ATCAATGGGC  | GTGGATAGCG | GTTTGACTCA | CGGGGATTTT | CAAGTCTCCA | CCCCATTGAC | 600  |
| GTCAATGGGA  | GTTTGTTTTG | GCACCAAAT  | CAACGGGACT | TTCCAAAATG | TCGTAACAAC | 660  |
| TCCGCCCCAT  | TGACGCAAAT | GGGCGGTAGG | CGTGTACGGT | GGGAGGTCTA | TATAAGCAGA | 720  |
| GCTCTCTGGC  | TAAGTAGAGA | ACCCACTGCT | TACTGGCTTA | TCGAAATTAA | TACGACTCAC | 780  |
| TATAGGGAGA  | CCCAAGCTCT | AGAGAATTCG | CGGCTCGAGG | TACCGGATCC | ATCGATGTGG | 840  |
| ACCTGCAGAA  | GCTTGCTAGA | GGATCTTTGT | GAAGGAACCT | TACTTCTGTG | GTGTGACATA | 900  |
| ATTGGACAAA  | CTACCTACAG | AGATTTAAAG | CTCTAAGGTA | AATATAAAAT | TTTTAAGTGT | 960  |
| ATAATGTGTT  | AAACTACTGA | TTCTAATTGT | TTGTGTATTT | TAGATTCCAA | CCTATGGAAC | 1020 |
| TGATGAATGG  | GAGCAGTGCT | GGATGCCTT  | TAATGAGGAA | AACCTGTTTT | GCTCAGAAGA | 1080 |
| AATGCCATCT  | AGTGATGATG | AGGCTACTGC | TGACTCTCAA | CATTCTACTC | CTCCAAAAAA | 1140 |
| GAAGAGAAAG  | GTAGAAGACC | CCAAGGACTT | TCCTTCAGAA | TTGCTAAGTT | TTTTGAGTCA | 1200 |
| TGCTGTGTTT  | AGTAATAGAA | CTCTTGCTTG | CTTTGCTATT | TACACCACAA | AGGAAAAAGC | 1260 |
| TGCACTGCTA  | TACAAGAAAA | TTATGGAAAA | ATATTTGATG | TATAGTGCCT | TGACTAGAGA | 1320 |
| TCATAATCAG  | CCATACCACA | TTTGTAGAGG | TTTTACTTGC | TTTAAAAAAC | CTCCCACACC | 1380 |
| TCCCCCTGAA  | CCTGAAACAT | AAAATGAATG | CAATTGTTGT | TGTTAACTTG | TTTATTGCAG | 1440 |
| CTTATAATGG  | TTACAAATAA | AGCAATAGCA | TCACAAATTT | CACAAATAAA | GCATTTTTTT | 1500 |
| CACTGCATTG  | TAGTTGTGGT | TTGTCCAAAC | TCATCAATGT | ATCTTATCAT | GTCTGGATCA | 1560 |
| ATTCTGAGAA  | ACTAGCCTTA | AAGACAGACA | GCTTTGTTCT | AGTCAGCCAG | GCAAGCATAT | 1620 |
| GTAATAAAG   | TTCCTCAGGG | AACTGAGGTT | AAAAGATGTA | TCCTGGACCT | GCCAGACCTG | 1680 |
| GCCATTACAG  | TAAACAGAAG | ATTCCGCCTC | AAGTTCCGGT | TAACAACAGG | AGGCAACGAG | 1740 |
| ATCATCGCTG  | TTCCTTAGGA | CCCTTTTACT | AACCCTAATT | CGATAGCATA | TGCTTCCCGT | 1800 |
| TGGGTAACAT  | ATGCTATTGA | ATTAGGGTTA | GTCTGGATAG | TATATACTAC | TACCCGGGAA | 1860 |
| GCAATATGCTA | CCCGTTTAGG | GTTAACAAGG | GGGCCTTATA | AACACTATTG | CTAATGCCCT | 1920 |

CTTGAGGGTC CGCTTATCGG TAGCTACACA GGCCCTCTG ATTGACGTTG GTGTAGCCTC 1980  
CCGTAGTCTT CCTGGGCCCC TGGGAGGTAC ATGTCCCCCA GCATTGGTGT AAGAGCTTCA 2040  
GCCAAGAGTT ACACATAAAG GCAATGTTGT GTTGCACTCC ACAGACTGCA AAGTCTGCTC 2100  
CAGGATGAAA GCCACTCAGT GTTGGCAAAT GTGCACATCC ATTTATAAGG ATGTCAACTA 2160  
CAGTCAGAGA ACCCCTTTGT GTTTGGTCCC CCCCCTGTG ACATGTGGAA CAGGGCCCAG 2220  
TTGGCAAGTT GTACCAACCA ACTGAAGGGA TTACATGCAC TGCCCCGCGT GAGCAATACA 2280  
AAACAAAAGC GCTCCTCGTA CCAGCGAAGA AGGGGCAGAG ATGCCGTAGT CAGGTTTAGT 2340  
TCGTCCGGCG GCGCCAGAAA TCCGCGCGGT GGTTTTGGG GGTGGGGGT GTTTGGCAGC 2400  
CACAGACGCC CGGTGTTTGT GTGCGCCAG TACATGCGGT CCATGCCAG GCCATCCAAA 2460  
AACCATGGGT CTGTCTGCTC AGTCCAGTCG TGGACCTGAC CCCACGCAAC GCCCAAAGA 2520  
ATAACCCCCA CGAACCATAA ACCATTCCCC ATGGGGGACC CCGTCCCTAA CCCACGGGGC 2580  
CCGTGGCTAT GCGGGGCTTG CCGCCCCGAC GTTGGCTGCG AGCCCTGGGC CTTACCCGA 2640  
ACTTGGGGGT TGGGTGGGG AAAAGGAAGA AACGCGGGCG TATTGGCCCC AATGGGTCT 2700  
CGGTGGGGTA TCGACAGAGT GCCAGCCCTG GGACCGAACC CCGCGTTTAT GAACAAACGA 2760  
CCCAACACCC GTGCGTTTTA TTCTGTCTTT TTATTGCCGT CATAGCGCGG GTTCCTTCCG 2820  
GTATTGTCTC CTTCCGTGTT TCAGTTAGCC TCCCCATCT CCGATCCCT ATTCCTTTGC 2880  
CCTCGGACGA GTGCTGGGGC GTCGGTTTCC ACTATCGGCG AGTACTTCTA CACAGCCATC 2940  
GGTCCAGACG GCCGCGCTTC TCGGGCGCAT TTGTGTACGC CCGACAGTCC CGGCTCCGGA 3000  
TCGGACGATT GCGTCGCATC GACCCTGCGC CCAAGCTGCA TCATCGAAAT TGCCGTCAAC 3060  
CAAGCTCTGA TAGAGTTGGT CAAGACCAAT GCGGAGCATA TACGCCCGGA GCCGCGGCGA 3120  
TCCTGCAAGC TCCGGATGCC TCCGCTCGAA GTAGCGCGTC TGCTGCTCCA TACAAGCCAA 3180  
CCACGGCCTC CAGAAGAAGA TGTTGGCGAC CTCGTATTGG GAATCCCCGA ACATCGCCTC 3240  
GCTCCAGTCA ATGACCGCTG TTATGCGGCC ATTGTTCGTC AGGACATTGT TGGAGCCGAA 3300  
ATCCGCGTGC ACGAGGTGCC GGAATTGCGG GCAGTCCTCG GCCCAAAGCA TCAGCTCATC 3360  
GAGAGCCTGC GCGACGGAGC CACTGACGGT GTCGTCCATC ACAGTTTGCC AGTGATACAC 3420

ATGGGGATCA GCAATCGCGC ATATGAAATC ACGCCATGTA GTGTATTGAC CGATTCCCTG 3480  
CGGTCCGAAT GGGCCGAACC CGCTCGTCTG GCTAAGATCG GCCGCAGCGA TCGCATCCAT 3540  
GGCCTCCGCG ACCGGCTGCA GAACAGCGGG CAGTTCGGTT TCAGGCAGGT CTTGCAACGT 3600  
GACACCCTGT GCACGGCGGG AGATGCAATA GGTCAAGGCTC TCGCTGAATT CCCCATGTG 3660  
AAGCACTTCC GGAATCGGGA GCGCGGCCGA TGCAAAGTGC CGATAAACAT AACGATCTTT 3720  
GTAGAAACCA TCGGCGCAGC TATTTACCCG CAGGACATAT CCACGCCCTC CTACATCGAA 3780  
GCTGAAAGCA CGAGATTCTT CGCCCTCCGA GAGCTGCATC AGGTCGGAGA CGCTGTCGAA 3840  
CTTTTCGATC AGAACTTCT CGACAGACGT CGCGGTGAGT TCAGGCTTTT TCATATCTCA 3900  
TTGCCCCCGG ACGAGGATCT GCGGCACGCT GTTGACGCTG TTAAGCGGGT CGCTGCAGGG 3960  
TCGCTCGGTG TTCGAGGCCA CACGCGTCAC CTTAATATGC GAAGTGGACC TGGGACCGCG 4020  
CCGCCCCGAC TGCATCTCGG TGTTCGAATT CGCCAATGAC AAGACGCTGG GCGGGGTTTG 4080  
TGTATCATA GAACTAAAGA CATGCAAATA TATTTCTTCC GGGGACACCG CCAGCAAACG 4140  
CGAGCAACGG GCCACGGGGA TGAAGCAGGG CGGCACCTCG CTAACGGATT CACCACTCCA 4200  
AGAATTGGAG CCAATCAATT CTTGCGGAGA ACTGTGAATG CGCAAACCAA CCCTTGGCAG 4260  
AACATATCCA TCGCGTCCGC CATCTCCAGC AGCCGCACGC GCGCATCTC GGGCAGCGTT 4320  
GGGTCTGGC CACGGGTGCG CATGATCGTG CTCCTGTCGT TGAGGACCCG GCTAGGCTGG 4380  
CGGGGTTGCC TTA CTGGTTA GCAGAATGAA TCACCGATA CCGAGCGAAC GTGAAGCGAC 4440  
TGCTGCTGCA AAACGTCTGC GACCTGAGCA ACAACATGAA TGGTCTTCGG TTTCCGTGTT 4500  
TCGTAAAGTC TGGAAACGCG GAAGTCAGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT 4560  
GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GCGGACGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT 4620  
ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC 4680  
CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA 4740  
GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA 4800  
CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC 4860  
CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCATA GCTCAGCGTG 4920

TAGGTATCTC ACTTCGGTGT AGGTCGTTCG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC 4980  
CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG 5040  
ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGSTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT 5100  
AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT 5160  
ATTTGGTATC TCGCTCTGCT TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG 5220  
ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC 5280  
GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA 5340  
GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCTGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC 5400  
CTAGATCCTT TTAAATTAAA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC 5460  
TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT 5520  
TCGTTTATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT 5580  
ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCAG CTCCAGATTT 5640  
ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG CAACTTTATC 5700  
CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTACA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA 5760  
TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTGC AGGCATCGTG GTGTACGCT CGTCGTTTGG 5820  
TATGGCTTCA TTCAGTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCCATGTT 5880  
GTGCAAAAAA GCGGTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCSTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC 5940  
ACTGTTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT 6000  
AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGATGCG 6060  
GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAC ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC 6120  
TTTAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT TTCGGGGCGA AACTCTCAA GGATCTTACC 6180  
GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGACCCC AACTGATCTT CAGCATCTTT 6240  
TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAGGG 6300  
AATAAGGGCG ACACGGAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG 6360  
CATTTATCAG GGTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA 6420

ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCTCG AAAAGTGCCA CCTGACGTCT AAGAAACCAT 6480  
TATTATCATG ACATTACCT ATAAAAATAG GCGTATCAG AGGCCCTTTC GTCTTCAAGA 6540  
ATTCTCATGT TTGACAGCTT ATCGATCCGG CCAACGGTGT TGCCATTGCT GCAGGCGCAG 6600  
AGCTGGTAGG TATGGAAGAT CTATACAGTG 6630

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der modulierenden Wirkung einer Substanz auf einen rezeptorabhängigen Signalübertragungsweg in der menschlichen oder tierischen Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß man die modulierende Wirkung der Substanz auf die Aktivität einer Phospholipase oder auf einen im Signalübertragungsweg der Phospholipaseaktivierung vorgeschalteten oder nachgeschalteten Mechanismus, ausgelöst durch einen an den Signalübertragungsweg gekoppelten Rezeptor, bestimmt, indem man Säugetierzellen, die
  - a) transformiert sind mit einer rekombinanten DNA, enthaltend ein Reportergen und eine regulatorische Sequenz, die auf die durch die Modulation der Phospholipase-Aktivität hervorgerufene Konzentrationsänderung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und eines Diacylglycerins (DAG) anspricht, so daß die Expression des Reportergens durch eine Konzentrationsänderung von IP<sub>3</sub>/DAG moduliert wird, und die weiters
  - b) transformiert sind mit einer rekombinanten DNA, enthaltend eine für einen Rezeptor, der mit dem Phospholipase-Effektorsystem gekoppelt ist, kodierende Sequenz derart, daß die Zellen den Rezeptor exprimieren,mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und die Konzentration des Reportergenproduktes mißt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in b) definierte rekombinante DNA eine Sequenz enthält, die für einen humanen Rezeptor kodiert.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die in a) definierte rekombinante DNA eine regulatorische Sequenz enthält, die auf die durch Modulation von Phospholipase C hervorgerufene Konzentrationsänderung von IP<sub>3</sub> und DAG anspricht, und daß die in b) definierte rekombinante DNA eine Sequenz enthält, die für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor kodiert.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man außerdem Säugetierzellen, die nur mit der in a) definierten rekombinanten DNA transformiert sind, unter identischen Bedingungen mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und die Konzentration des Reporterergenproduktes mißt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man außerdem Säugetierzellen, die transformiert sind mit rekombinanter DNA, enthaltend das Reportergen und eine regulatorische Sequenz, die auf die durch die Modulation von Adenylatzyklase hervorgerufene Konzentrationsänderung von cAMP anspricht, so daß die Expression des Reportergens durch eine Konzentrationsänderung von cAMP moduliert wird, mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und die Konzentration des Reporterergenproduktes mißt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man außerdem Zellen, die mit einer auf cAMP anprechenden rekombinanten DNA und mit einer in b) definierten rekombinanten DNA, enthaltend die für denselben Rezeptor kodierende Sequenz wie die Zellen, die mit der auf IP<sub>3</sub>/DAG ansprechender

rekombinanter DNA transformiert sind, mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und die Konzentration des Reporterergenproduktes mißt.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man außerdem Zellen, die transformiert sind mit einer rekombinanten DNA, enthaltend eine für einen Rezeptor, der mit dem Adenylatkyklase-Effektorsystem gekoppelt ist, kodierende Sequenz derart, daß die Zellen den Rezeptor exprimieren, mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und die Konzentration des Reporterergenproduktes mißt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es als Screening-Assay eingesetzt wird, in dem die zu untersuchende Substanz eine von zahlreichen Substanzen ist, mit denen eine vorbestimmte Zahl von Säugetierzellen unter vorbestimmten Bedingungen inkubiert und die Konzentration des Reporterergenproduktes gemessen wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporterergenprodukt Luciferase in Gegenwart eines Reagens mißt, das ein zur Lyse der Zellen geeignetes Detergens, einen Puffer mit pH-Wert 6 bis 9, vorzugsweise pH 7.8, ein Magnesiumsalz, vorzugsweise Magnesiumsulfat, Adenosintriphosphat, Luciferin, ein mildes organisches Reduktionsmittel wie Dithiothreitol und/oder  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie gegebenenfalls Natriumtripolyphosphat und/oder Natriumpyrophosphat enthält.
10. Reagens zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein zur

Lyse der Zellen geeignetes Detergens, einen Puffer mit pH-Wert 6 bis 9, vorzugsweise pH 7.8, ein Magnesiumsalz, vorzugsweise Magnesiumsulfat, Adenosintriphosphat, Luciferin, ein mildes organisches Reduktionsmittel wie Dithiothreitol und/oder  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie gegebenenfalls Natriumtripolyphosphat und/oder Natriumpyrophosphat enthält.

11. Rekombinante DNA, enthaltend ein Reportergen und eine damit funktionell verbundene Expressionskontrollsequenz für die Expression in Säugetierzellen, dadurch gekennzeichnet, daß die Expressionskontrollsequenz eine regulatorische Sequenz enthält, die auf die durch die Modulation von Phospholipase hervorgerufene Konzentrationsänderung von IP<sub>3</sub> und DAG anspricht, zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
12. Rekombinante DNA nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine regulatorische Sequenz natürlichen Ursprungs enthält.
13. Rekombinante DNA nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie die 5'-regulatorische Sequenz eines durch IP<sub>3</sub>/DAG induzierbaren Gens enthält.
14. Rekombinante DNA nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie die 5'-regulatorische Sequenz des ICAM-1-Gens enthält.
15. Rekombinante DNA nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Sequenz synthetisch hergestellt ist.

16. Rekombinante DNA nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Sequenz mehrere auf die Modulation von IP<sub>3</sub>/DAG ansprechende regulatorische Elemente in Abstand zueinander enthält.
17. Rekombinante DNA nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß sie drei bis zwölf regulatorische Elemente enthält.
18. Rekombinante DNA nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein Teil der regulatorischen Elemente und/oder der zwischen ihnen gelegenen Sequenzabschnitte sich voneinander unterscheidet.
19. Rekombinante DNA nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie drei TRE-Elemente des ICAM-1-Gens enthält.
20. Rekombinante DNA nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie sechs TRE-Elemente des ICAM-1-Gens enthält.
21. Rekombinante DNA nach einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Reportergen ein Luciferasegen enthält.
22. Rekombinante DNA nach einem der Ansprüche 11 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Markergen enthält.
23. Säugetierzellen, transformiert mit einer rekombinanten DNA gemäß einem der Ansprüche 11 bis 22.

24. Säugetierzellen nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem transformiert sind mit einer rekombinanten DNA, enthaltend eine für einen Rezeptor, der mit dem Phospholipase-Effektorsystem gekoppelt ist, kodierende Sequenz derart, daß die Zellen den Rezeptor exprimieren.
25. Säugetierzellen nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA eine für einen humanen Rezeptor kodierende Sequenz enthält.
26. Säugetierzellen nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA eine für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor kodierende Sequenz enthält.
27. Säugetierzellen nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Expressionskontrollsequenz eine regulatorische Sequenz enthält, die auf die durch die Modulation von Phospholipase C hervorgerufene Konzentrationsänderung von IP<sub>3</sub> und DAG anspricht.
28. Säugetierzellen nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß sie transformiert sind mit rekombinanter DNA, enthaltend eine Sequenz, kodierend für einen Rezeptor, ausgewählt aus der Gruppe Serotonin-Rezeptoren vom 5-HT<sub>1C</sub>- und vom 5-HT<sub>2</sub>-Typ, Thrombin-Rezeptor, Neuropeptid Y-Rezeptoren, Neurokinin-Rezeptoren, PAF-Rezeptoren, Angiotensin-Rezeptoren, muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren vom M<sub>1</sub>-, M<sub>3</sub>- und M<sub>5</sub>-Typ.
29. Rekombinante DNA, enthaltend ein Reportergen und eine damit funktionell verbundene

Expressionskontrollsequenz für die Expression in Säugetierzellen, dadurch gekennzeichnet, daß die Expressionskontrollsequenz eine regulatorische Sequenz enthält, die auf die durch Modulation von Adenylatzyklase hervorgerufene Konzentrationsänderung von cAMP anspricht, zur Verwendung in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 bis 9.

30. Rekombinante DNA nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Sequenz synthetisch hergestellt ist.
31. Rekombinante DNA nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Sequenz mehrere auf die Modulation von cAMP ansprechende regulatorische Elemente - Abstand zueinander enthält.
32. Rekombinante DNA nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß sie drei bis zwölf regulatorische Elemente enthält.
33. Rekombinante DNA nach Anspruch 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein Teil der regulatorischen Elemente und/oder der zwischen ihnen gelegenen Sequenzabschnitte sich voneinander unterscheidet.
34. Rekombinante DNA nach einem der Ansprüche 29 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Reportergen ein Luciferasegen enthält.
35. Rekombinante DNA nach einem der Ansprüche 29 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Markergen enthält.

36. Säugetierzellen, transformiert mit einer rekombinanten DNA nach einem der Ansprüche 29 bis 35.
37. Säugetierzellen nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem transformiert sind mit einer rekombinanten DNA, enthaltend eine für einen Rezeptor, der mit dem Phospholipase-Effektorsystem gekoppelt ist, kodierende Sequenz derart, daß die Zellen den Rezeptor exprimieren.
38. Säugetierzellen nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß sie transformiert sind mit rekombinanter DNA, enthaltend eine Sequenz, kodierend für einen Rezeptor, ausgewählt aus der Gruppe Serotonin-Rezeptoren vom 5-HT<sub>1C</sub>- und vom 5-HT<sub>2</sub>-Typ, Thrombin-Rezeptor, Neuropeptid Y-Rezeptoren, Neurokinin-Rezeptoren, PAF-Rezeptoren, Angiotensin-Rezeptoren, muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren vom M<sub>1</sub>-, M<sub>3</sub>- und M<sub>5</sub>-Typ.
39. Säugetierzellen nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß sie außerdem transformiert sind mit einer rekombinanten DNA, enthaltend eine für einen Rezeptor, der mit dem Adenylatzyklase-Effektorsystem gekoppelt ist, kodierende Sequenz derart, daß die Zellen den Rezeptor exprimieren.
40. Säugetierzellen nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß sie transformiert sind mit rekombinanter DNA, enthaltend eine Sequenz, kodierend für einen Rezeptor, ausgewählt aus der Gruppe muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren vom M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Typ, Dopamin-Rezeptoren vom D<sub>1</sub>-, D<sub>2</sub><sub>1</sub>-, D<sub>2</sub><sub>s</sub>- und D<sub>5</sub>-Typ, Serotonin-Rezeptoren vom 5-HT<sub>1A</sub>-

und 5-HT<sub>1D</sub>-Typ, Adenosin-Rezeptoren vom A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Typ.

1/48

Fig. 1

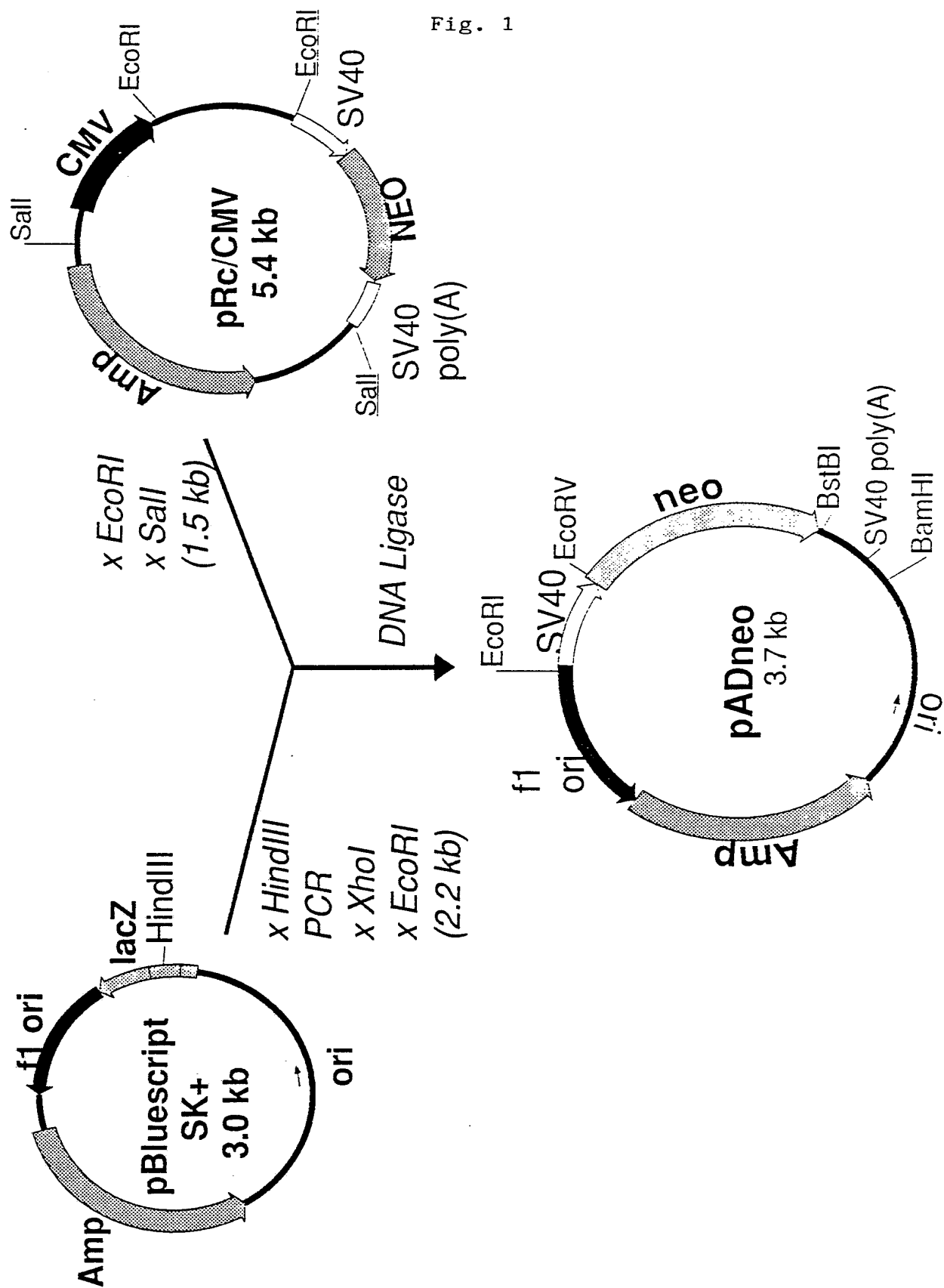


Fig. 2

# *BglIII - BamHI Fragment nach PCR von pX1*

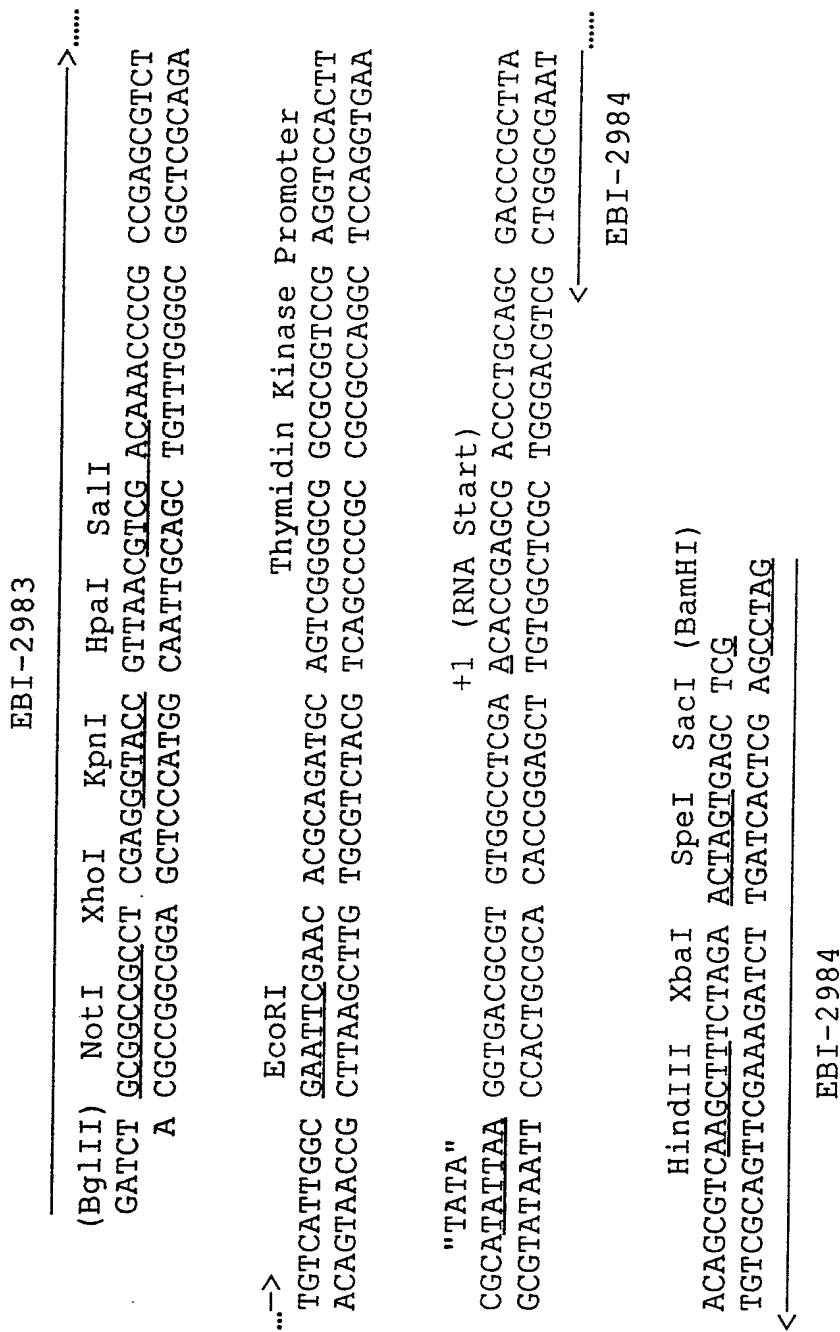


Fig. 3

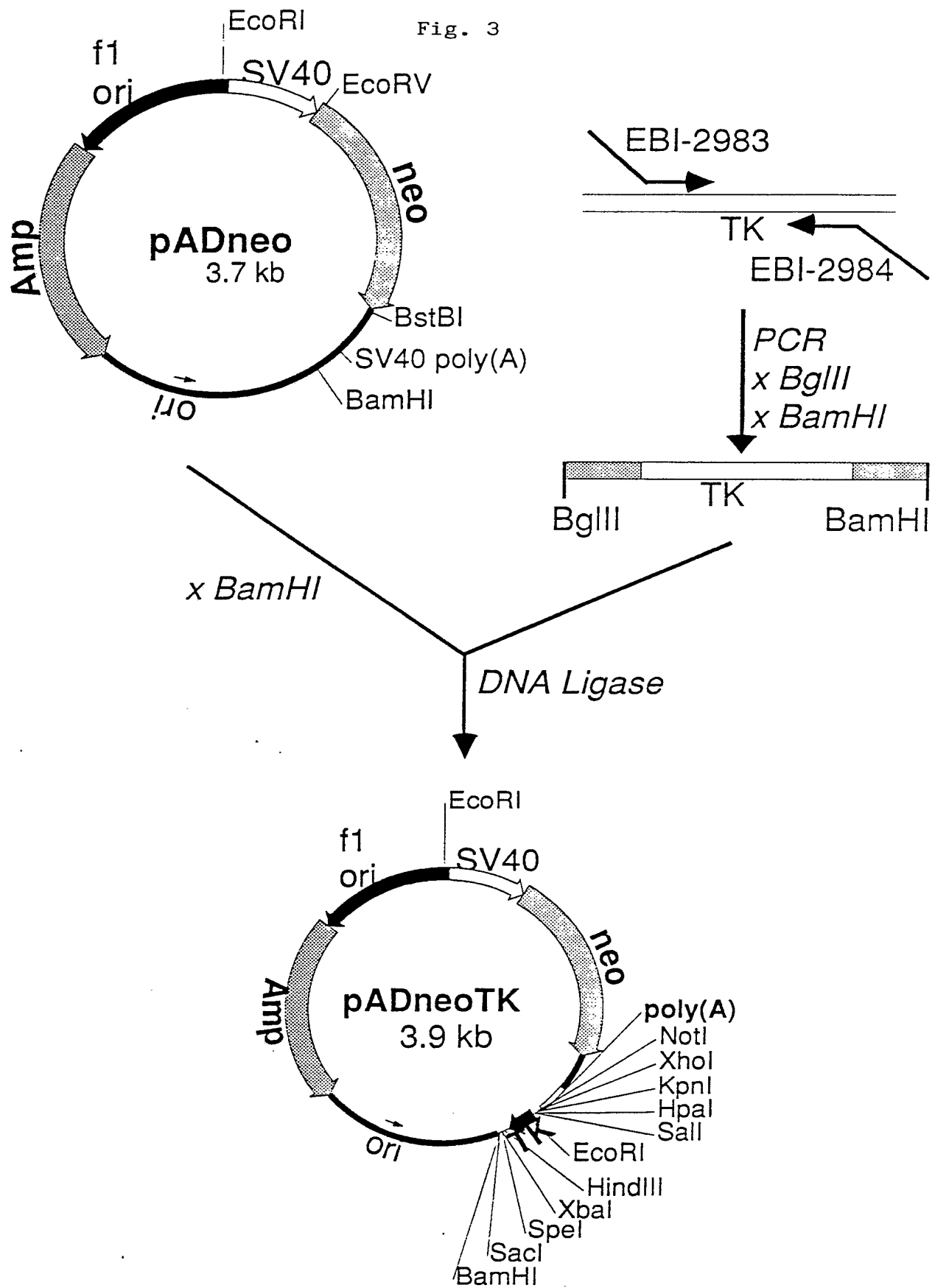
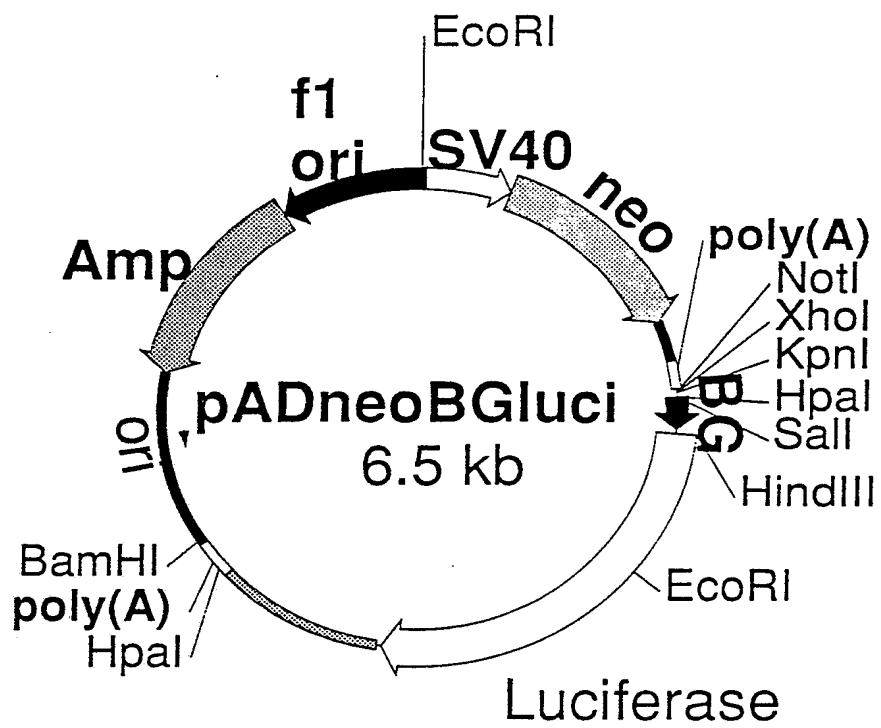
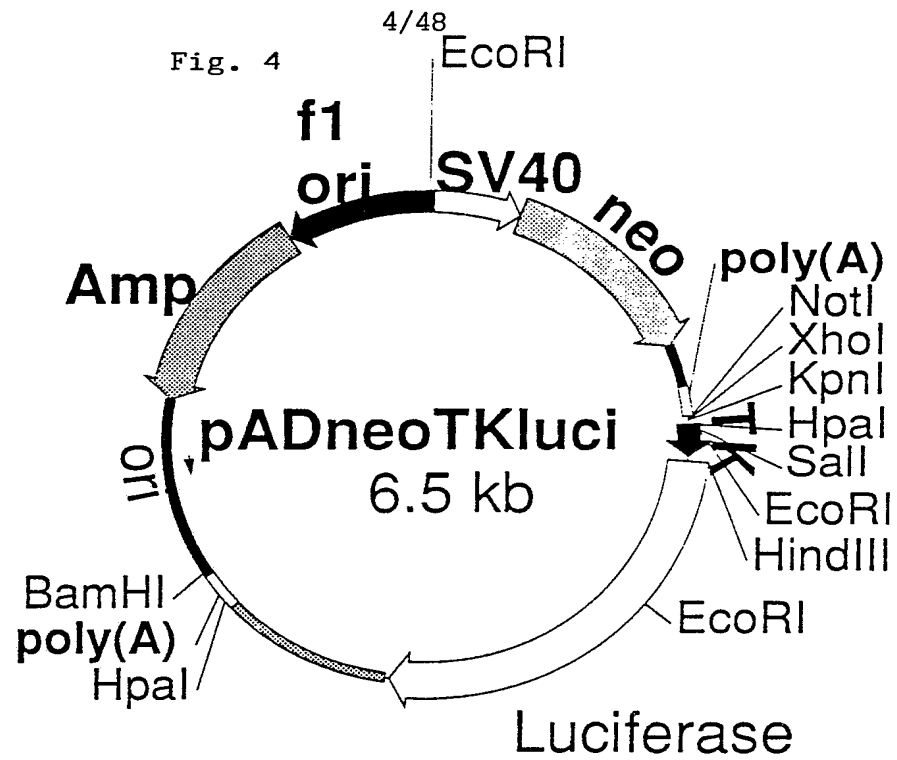
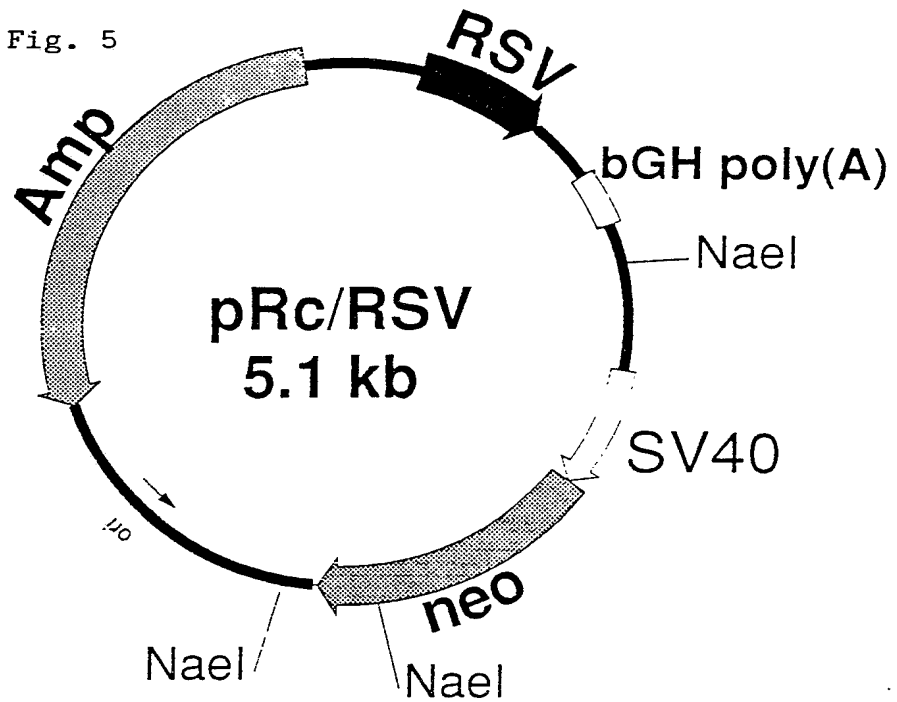


Fig. 4



5/48

Fig. 5



$\times$  *NaeI*  
(3.8 kb)

*DNA Ligase*

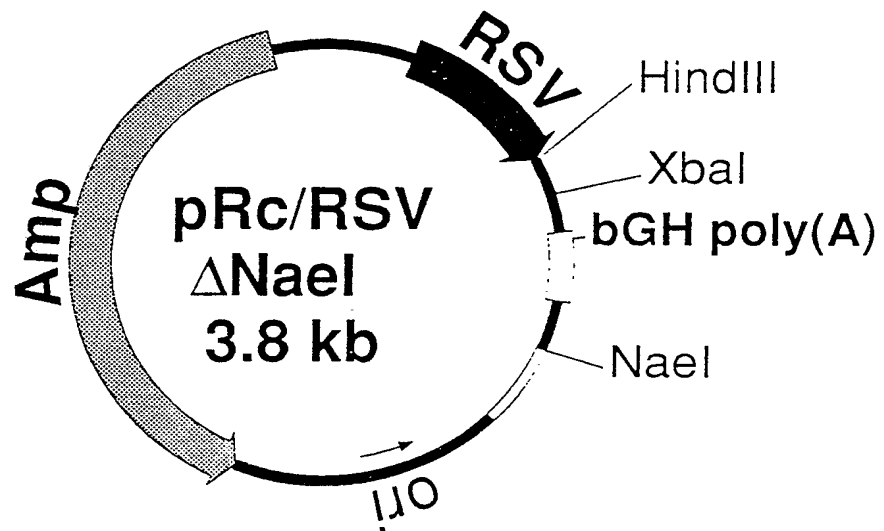
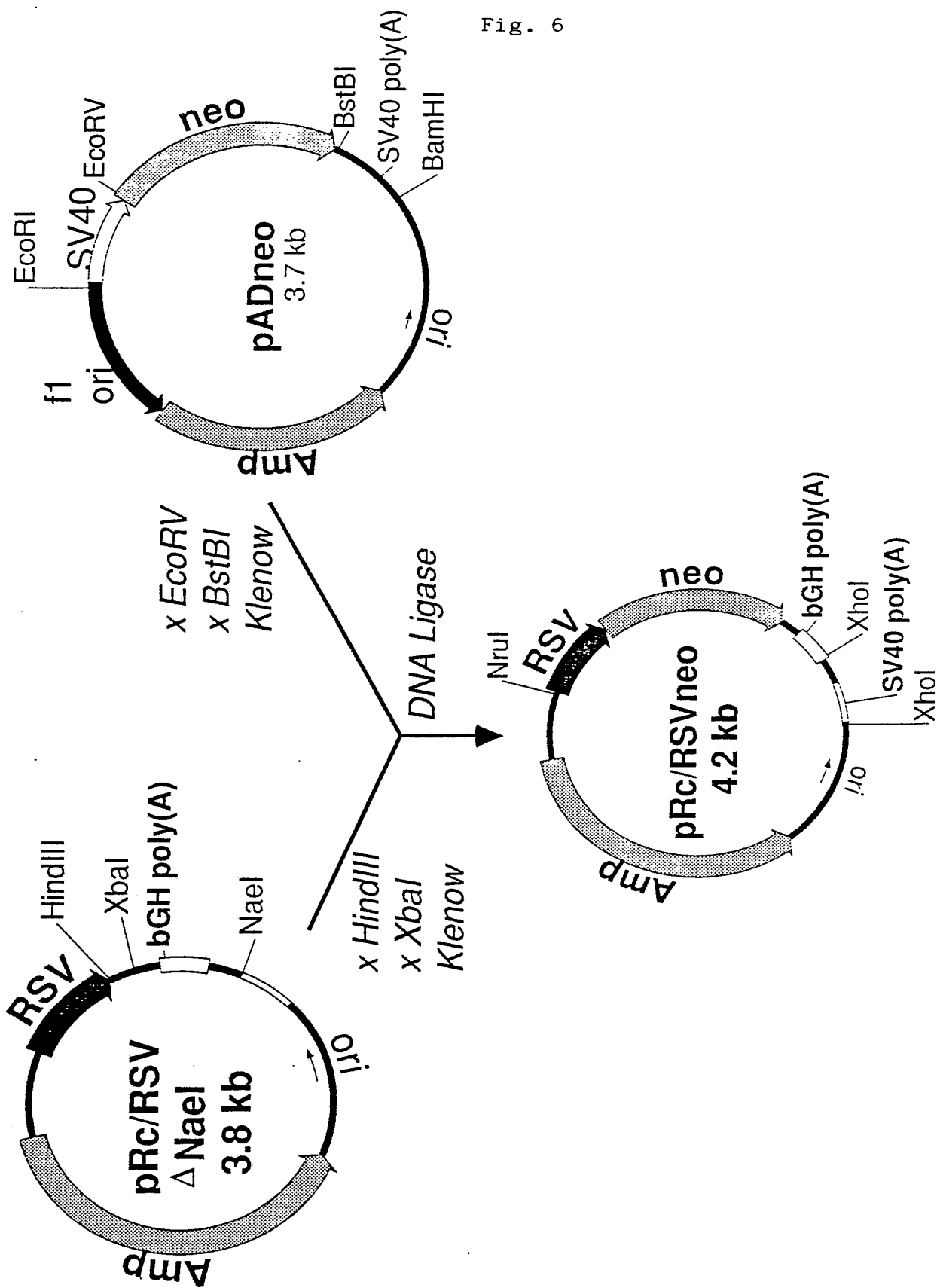
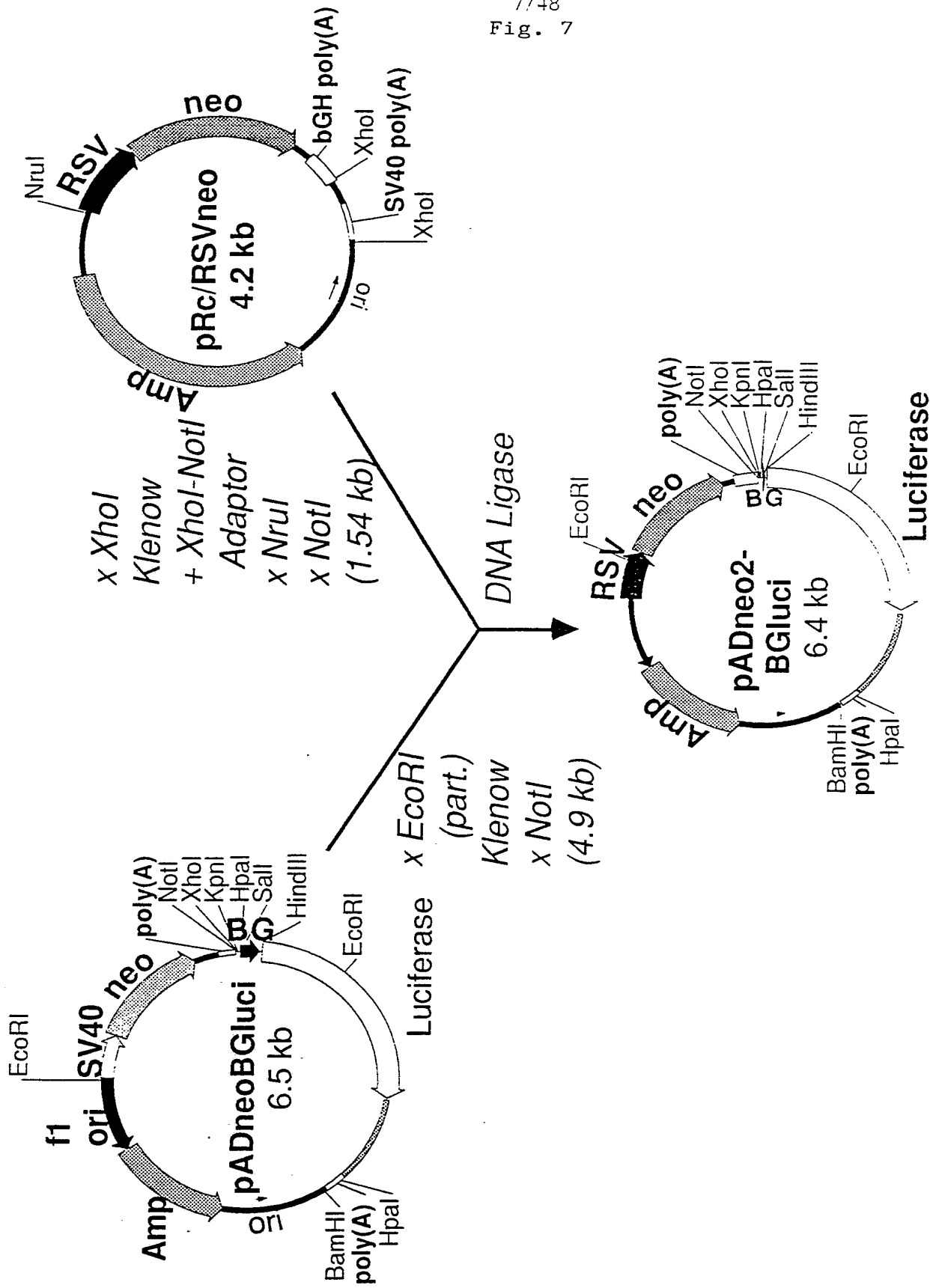


Fig. 6



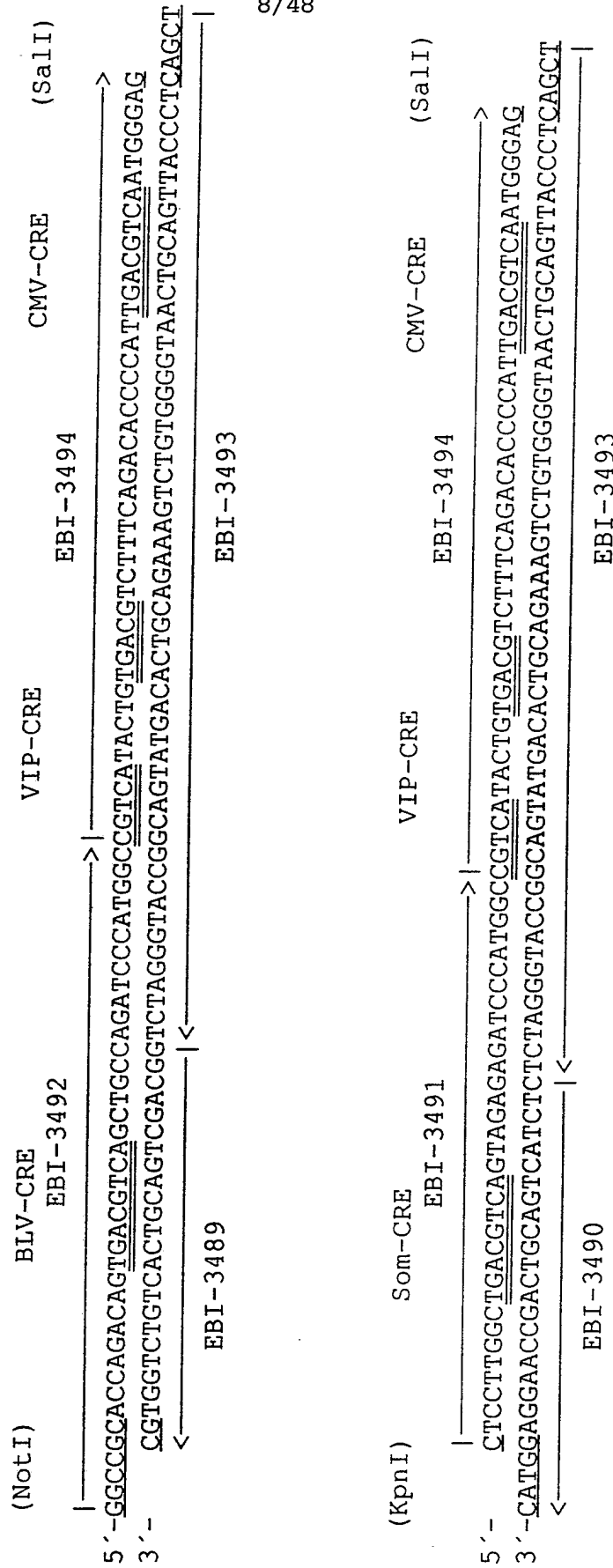
7/48  
Fig. 7



# CRE - OLIGONUKLEOTIDE

Fig. 8

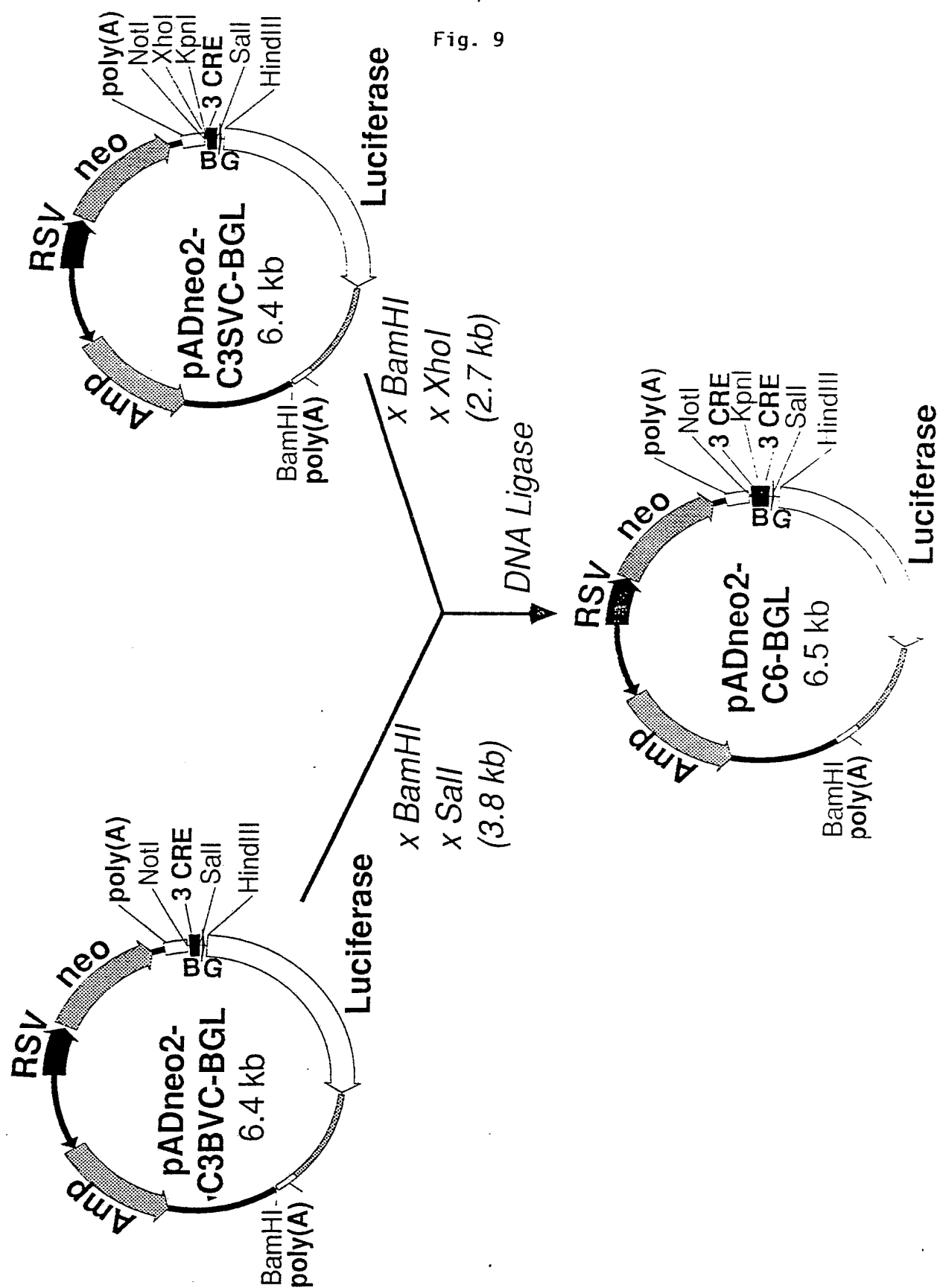
8/48

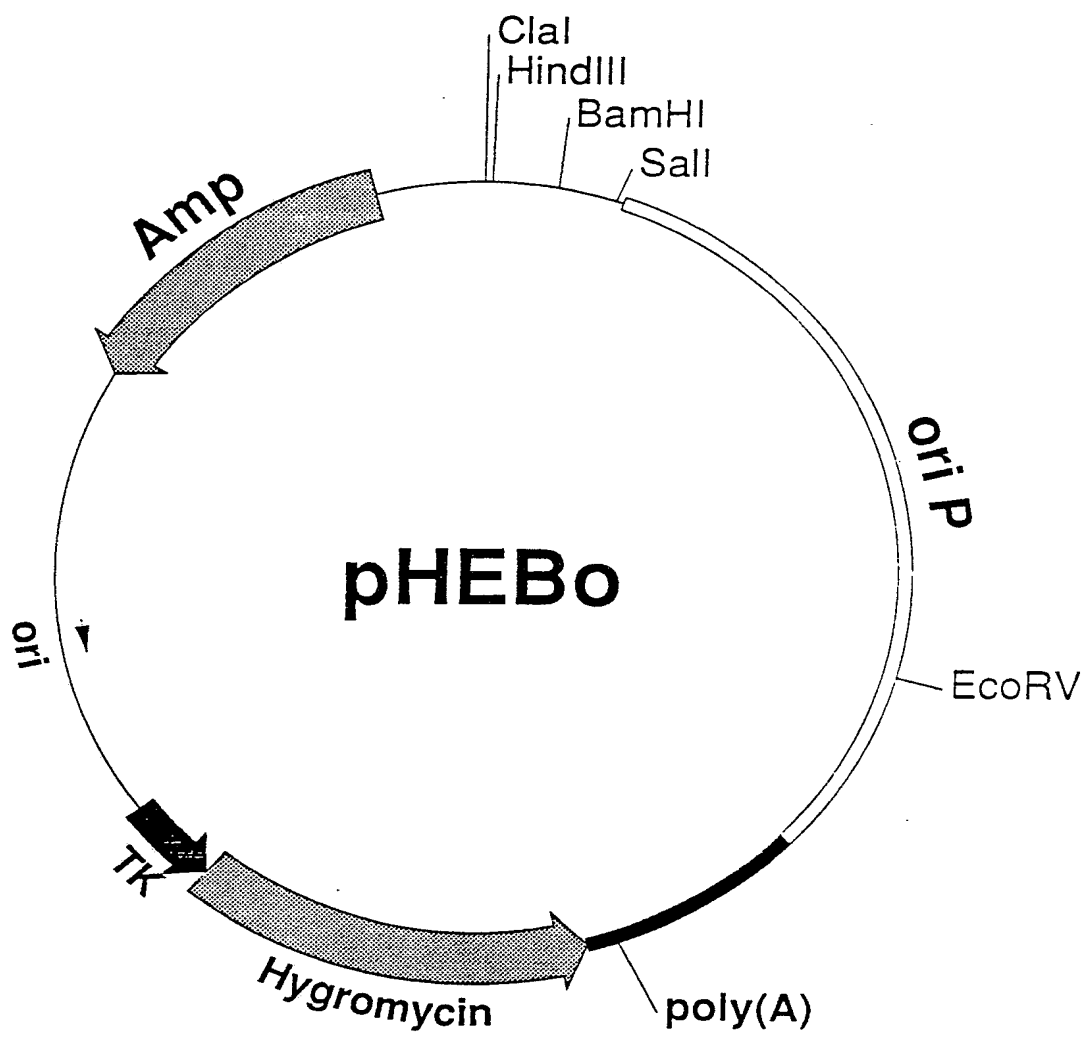


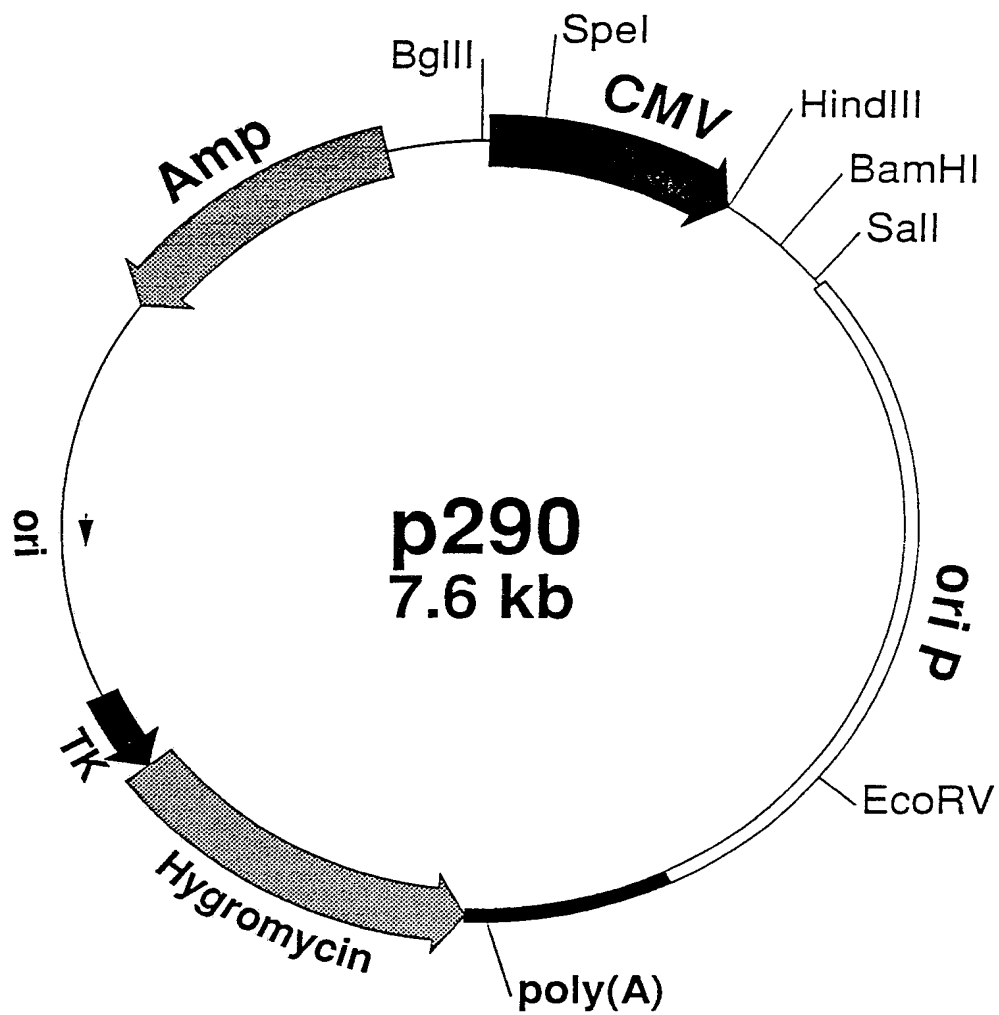
ERSATZBLATT

9/48

Fig. 9



10/48  
Fig. 10

11/48  
Fig. 11

12/48

Fig. 12

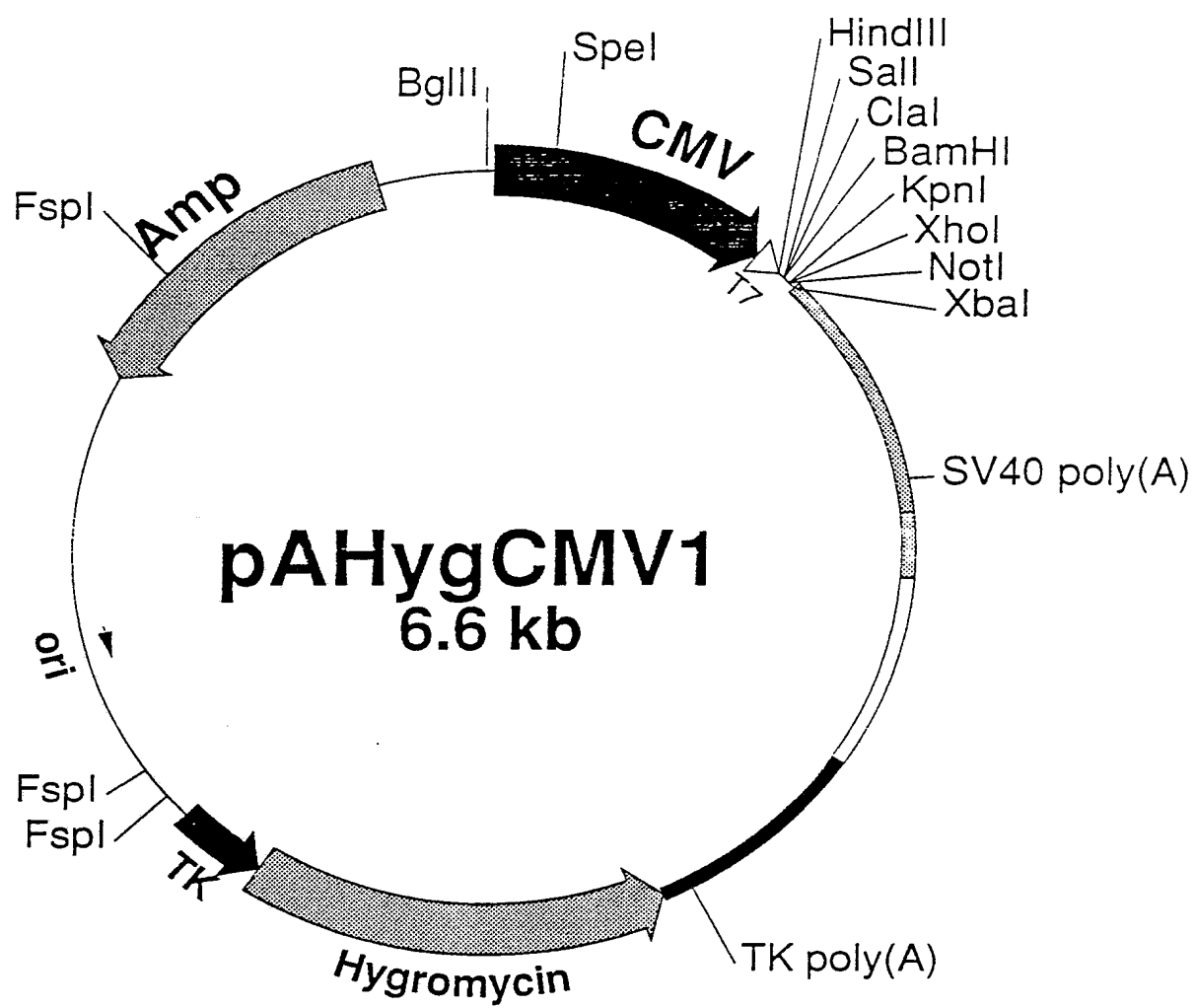
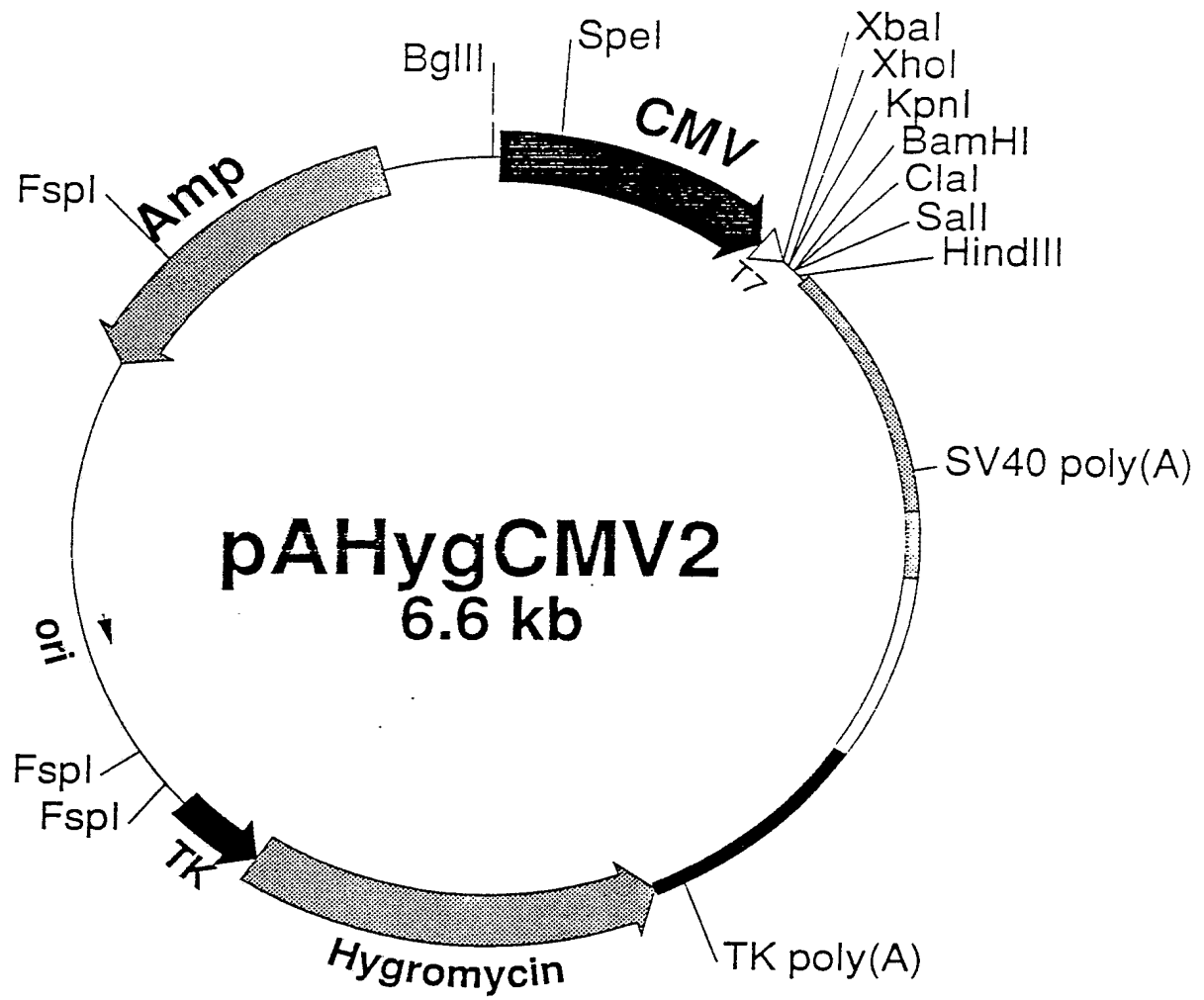
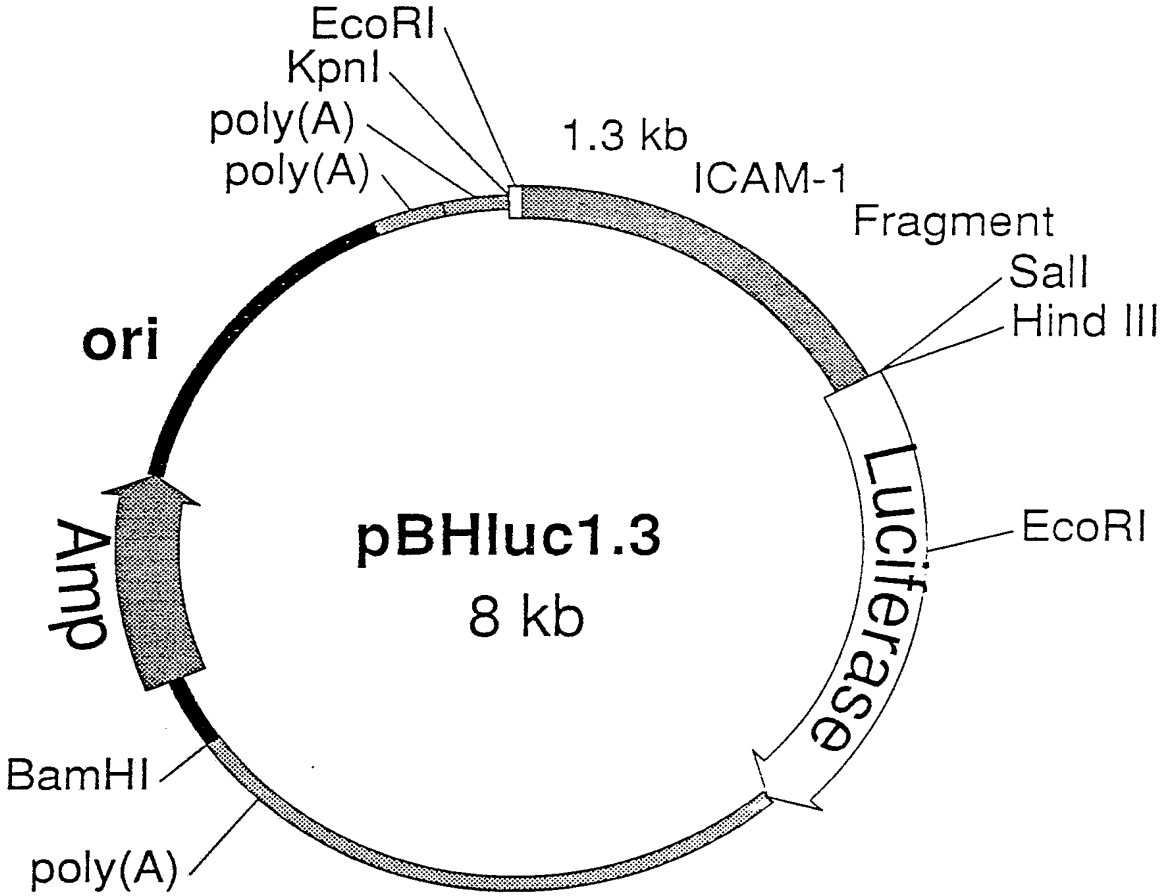


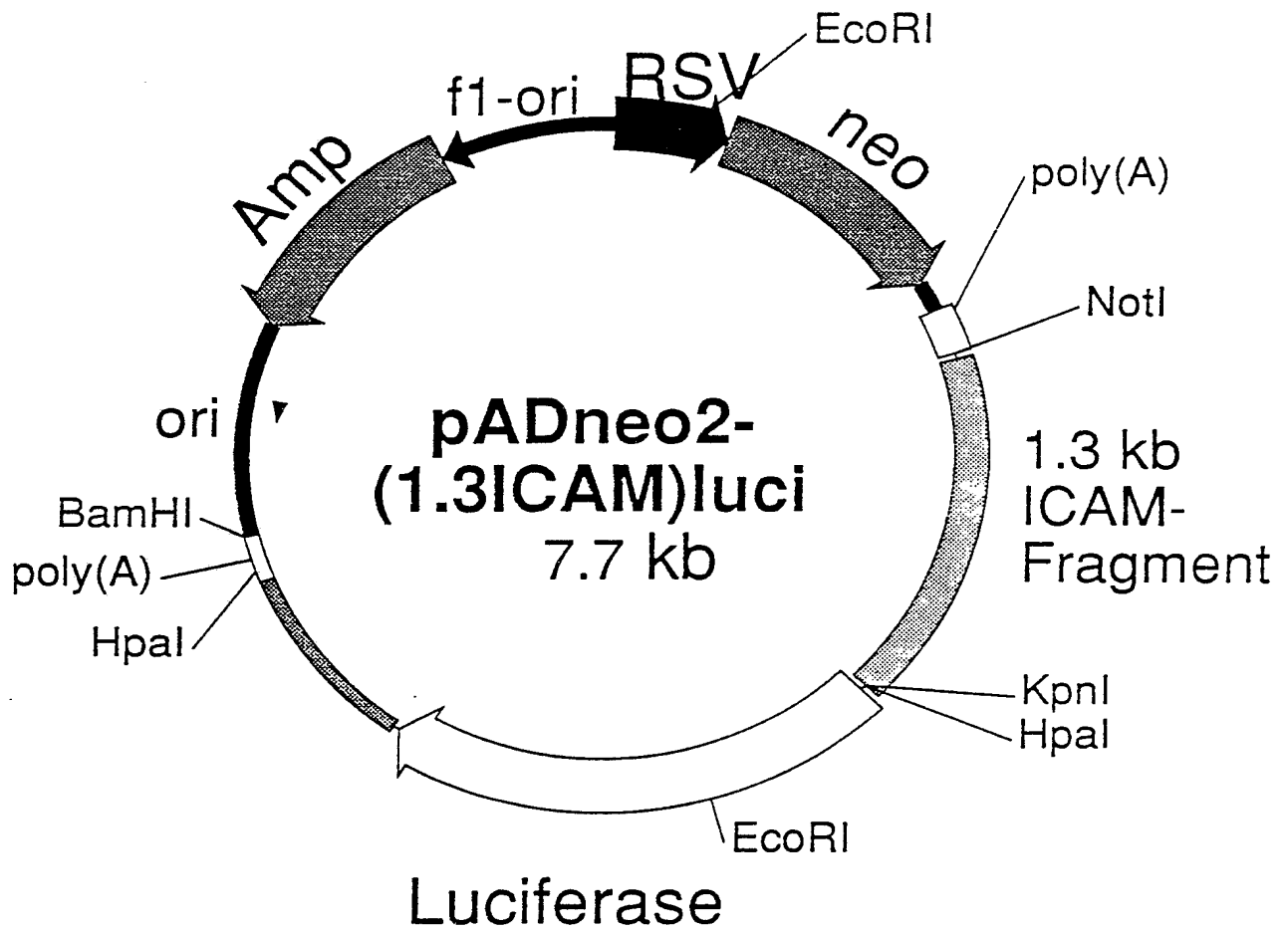
Fig. 13

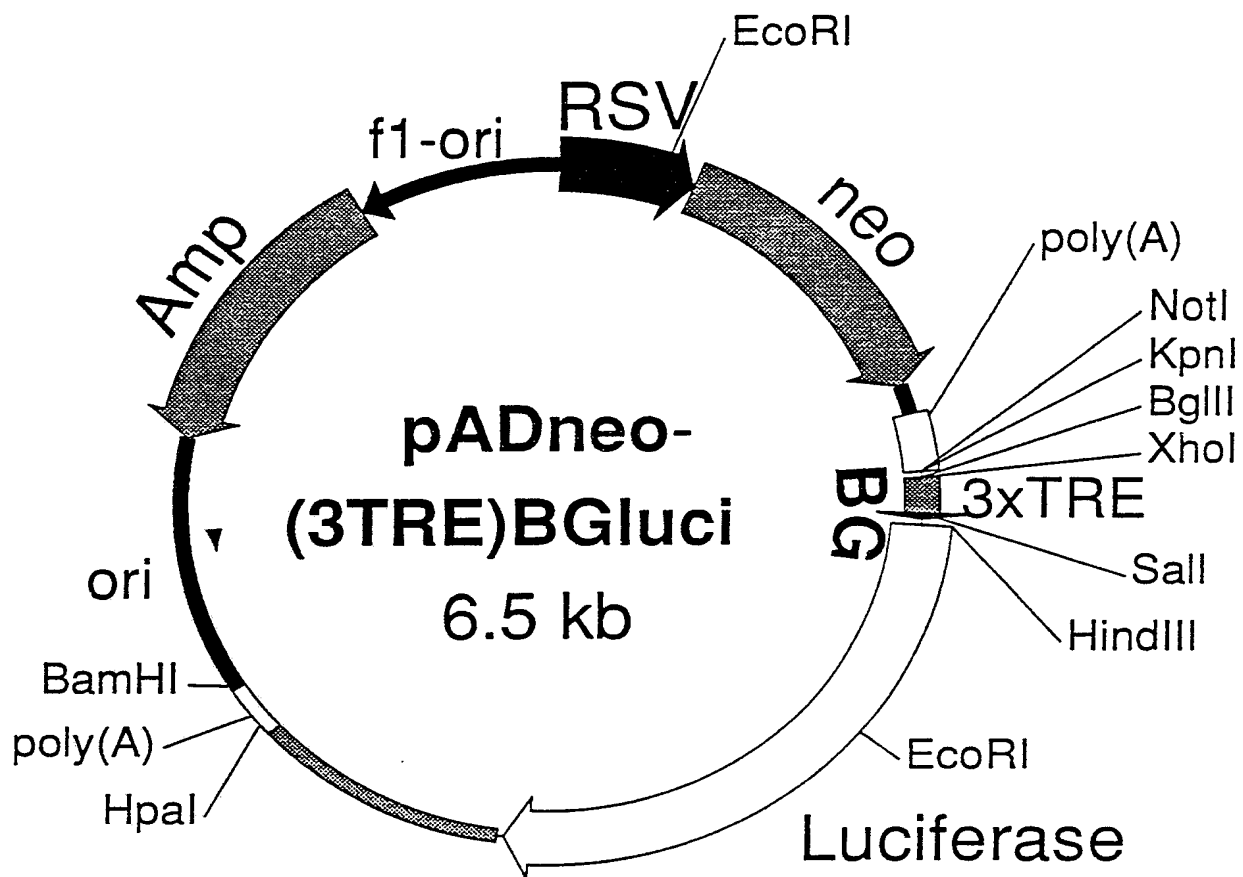


14/48  
Fig. 14



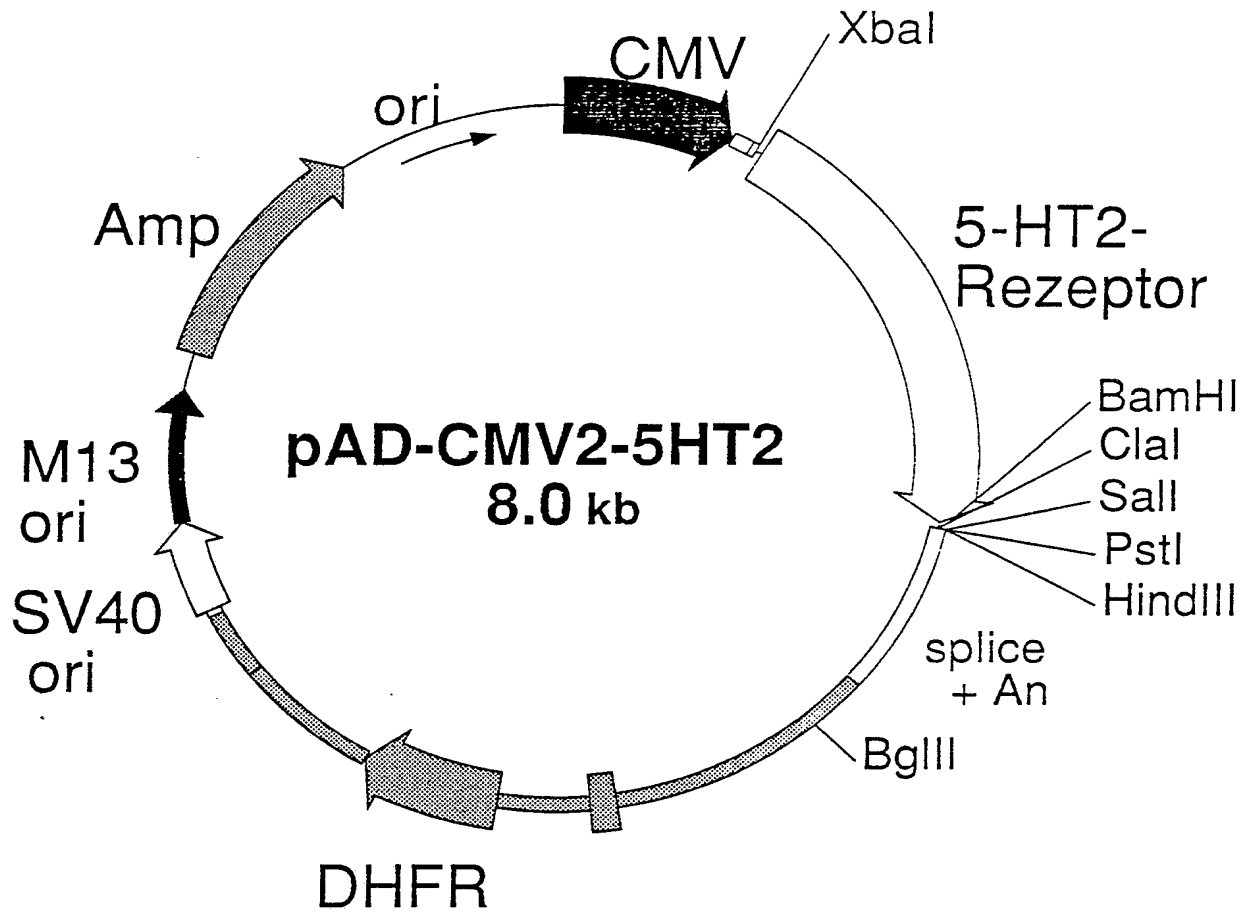
15/48  
Fig. 15



16/48  
Fig. 16

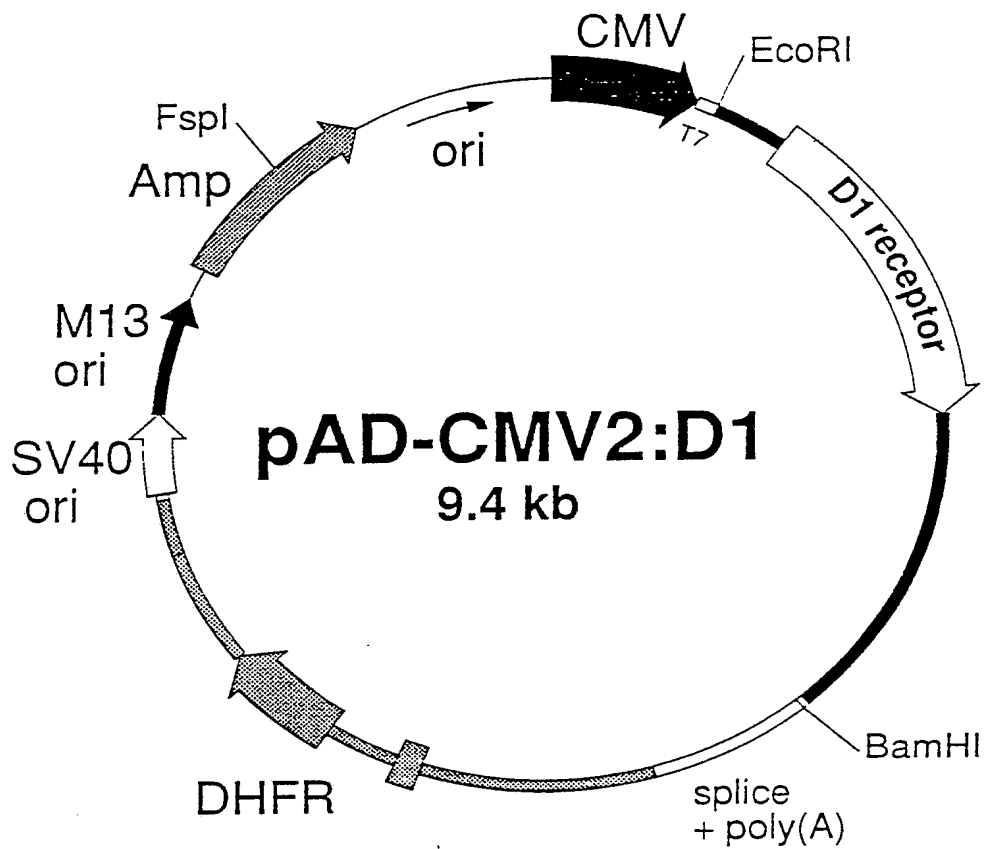
17/48

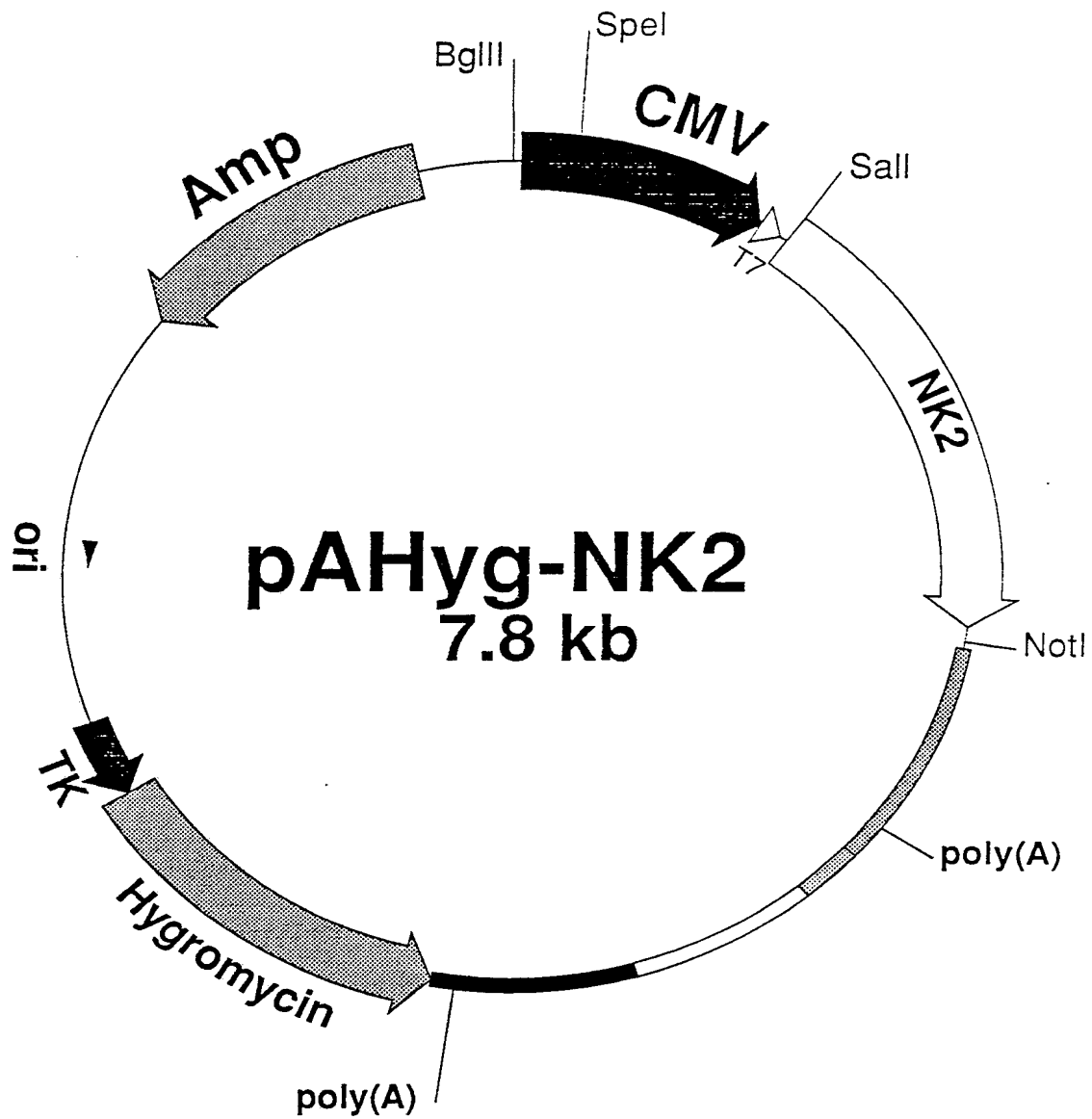
Fig. 17

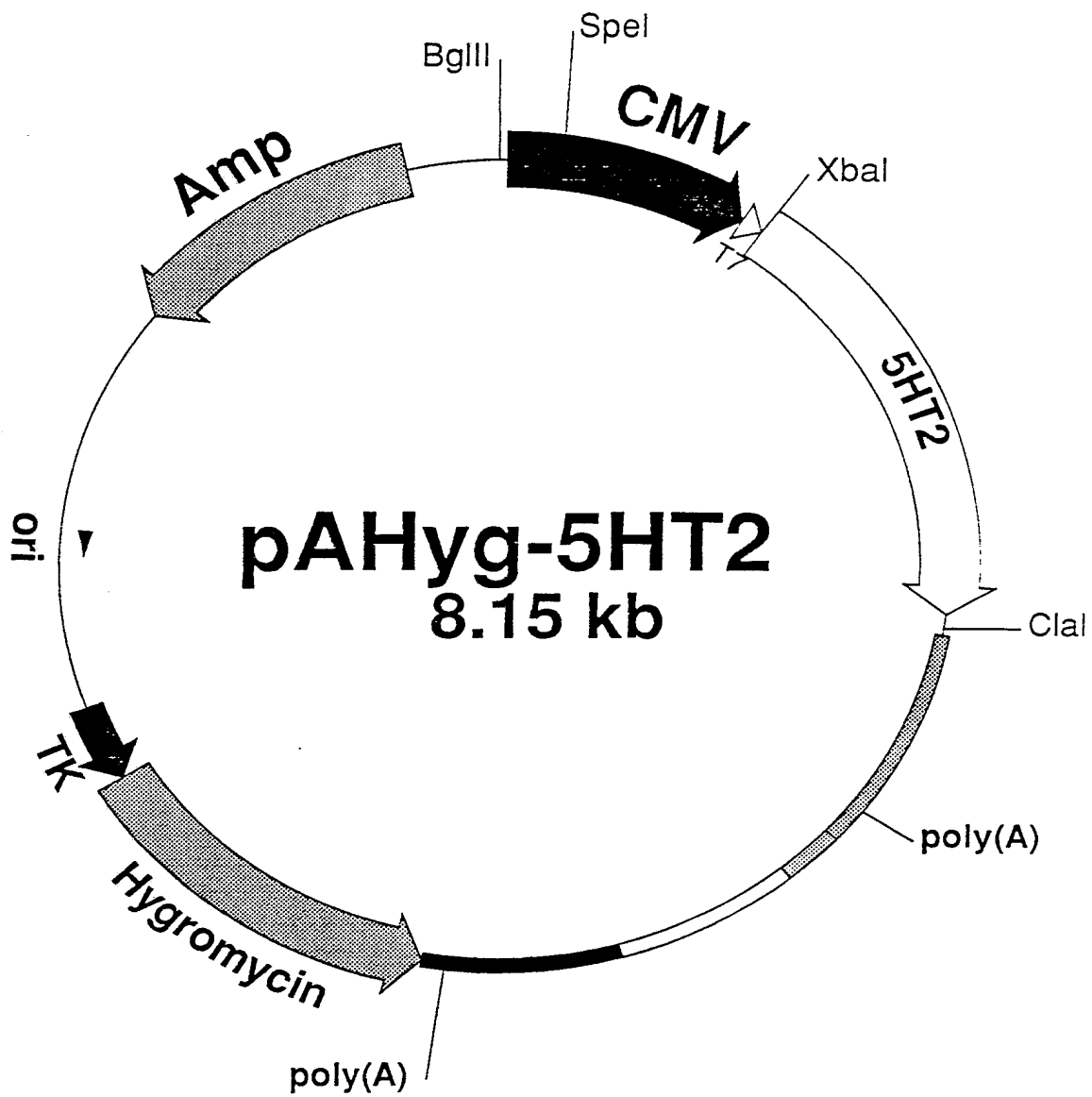


18/48

Fig. 18



19/48  
Fig. 19A

20/48  
Fig. 19B

21/48

Fig. 20

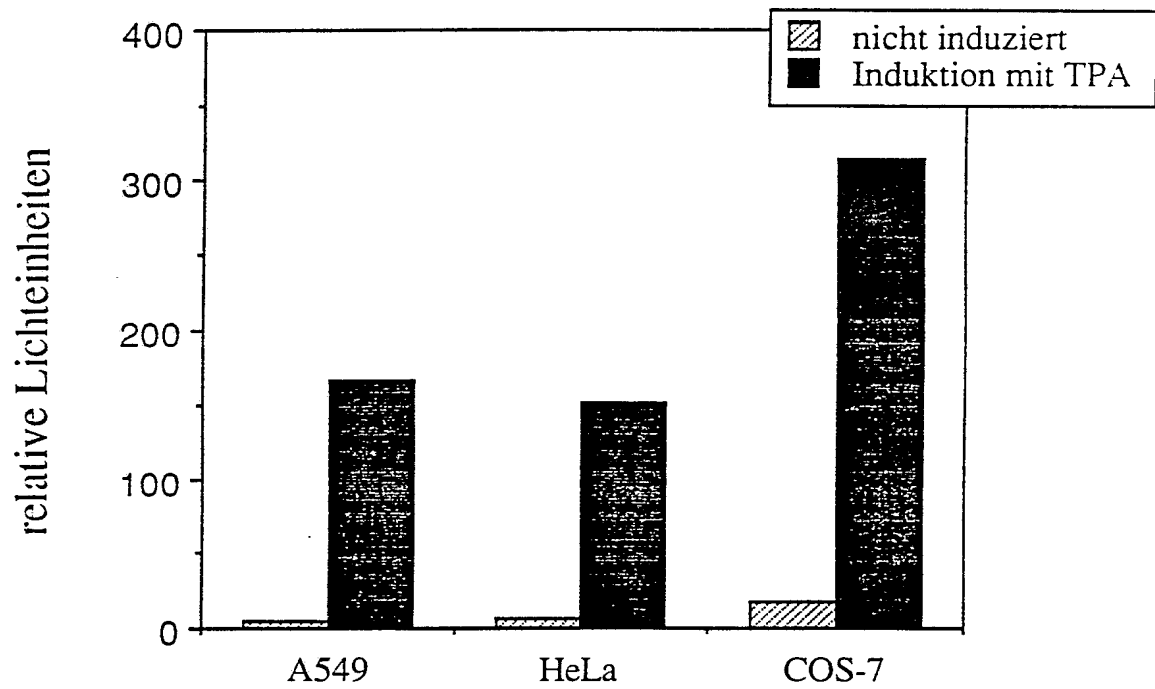
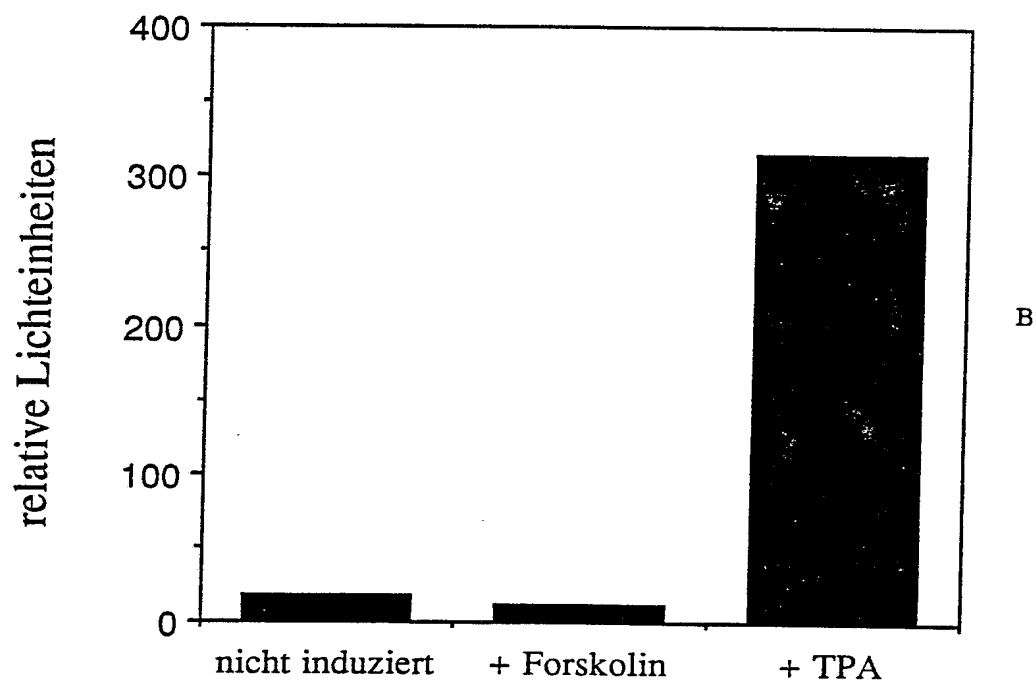
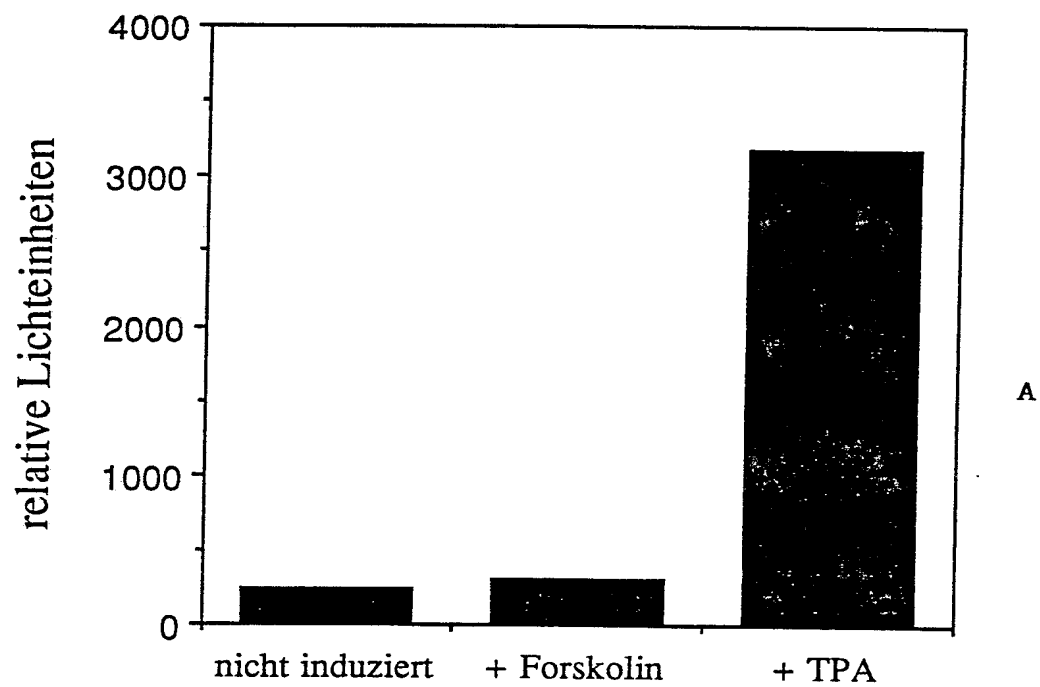
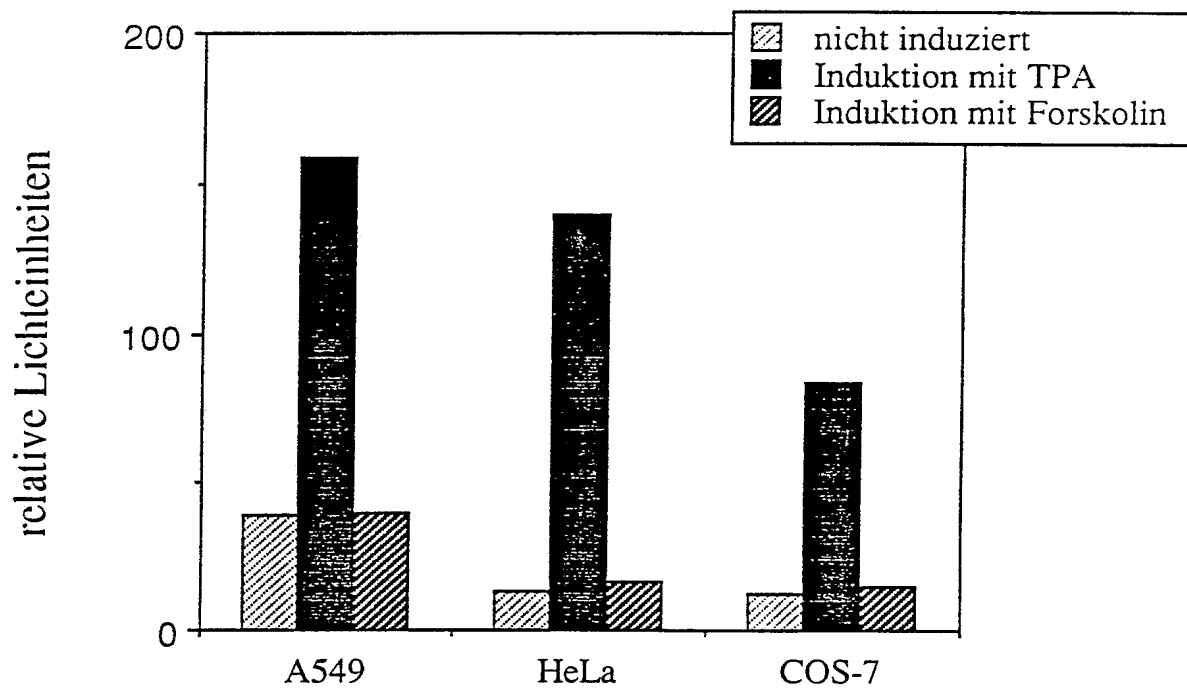


Fig. 21



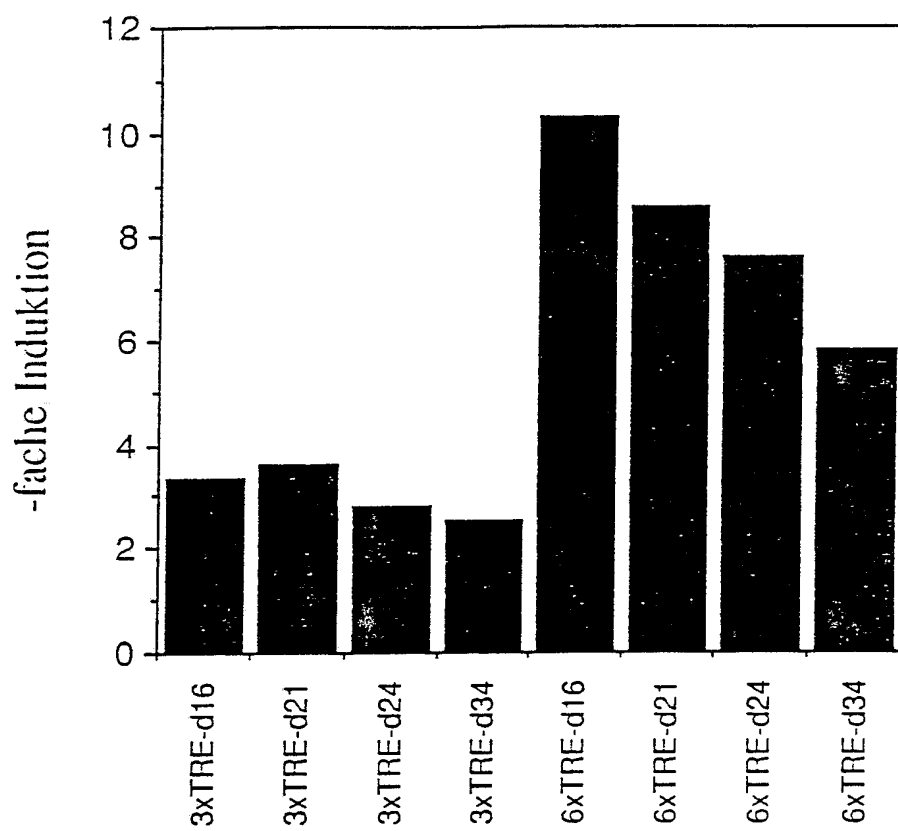
23/48

Fig. 22



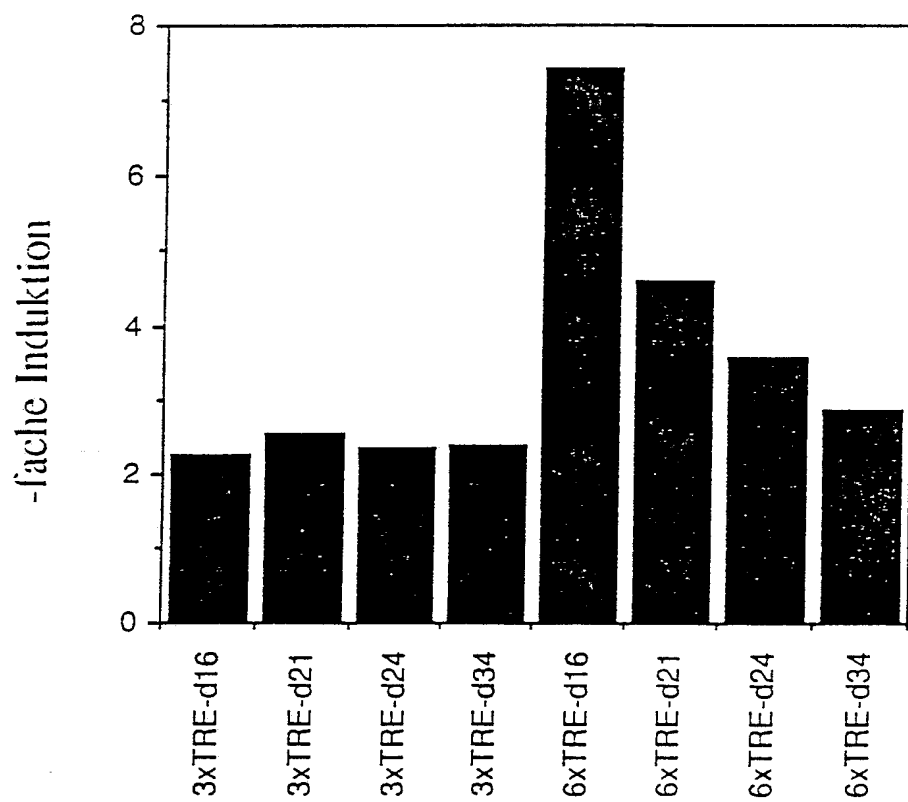
24/48

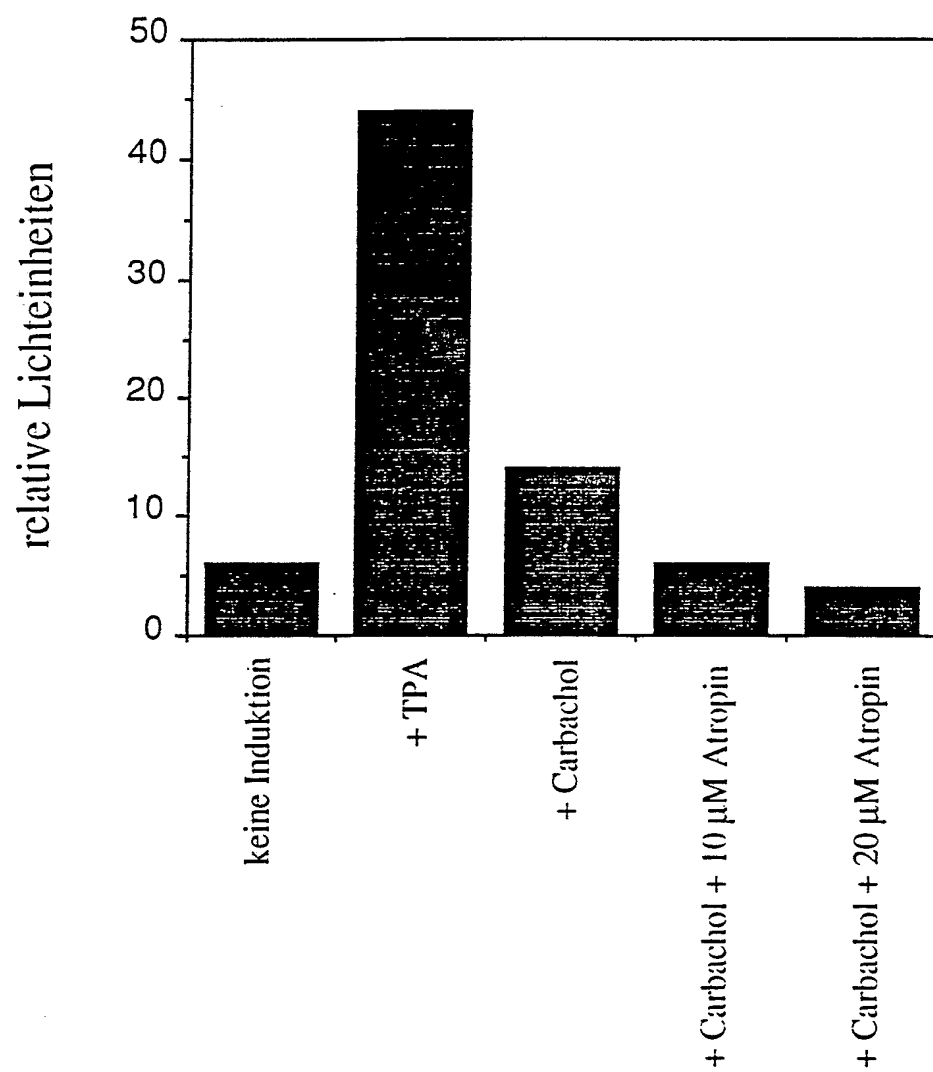
Fig. 23A



25/48

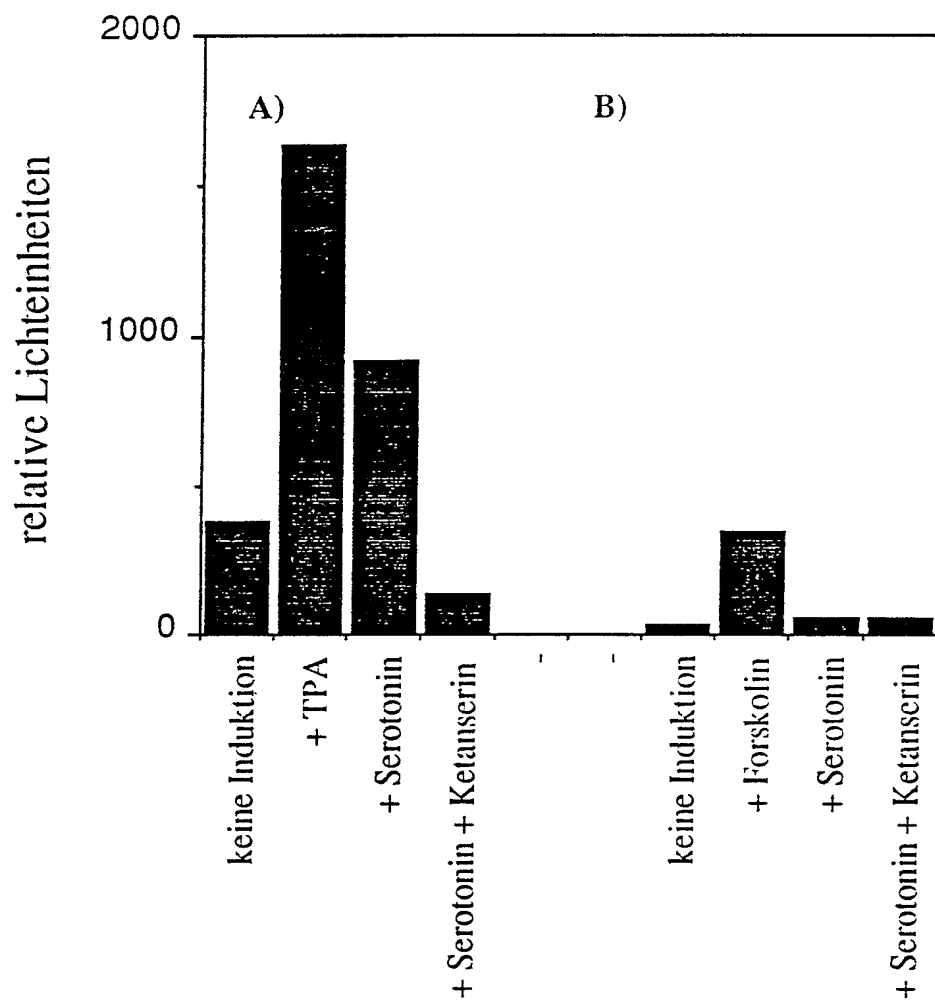
Fig. 238



26/48  
Fig. 24

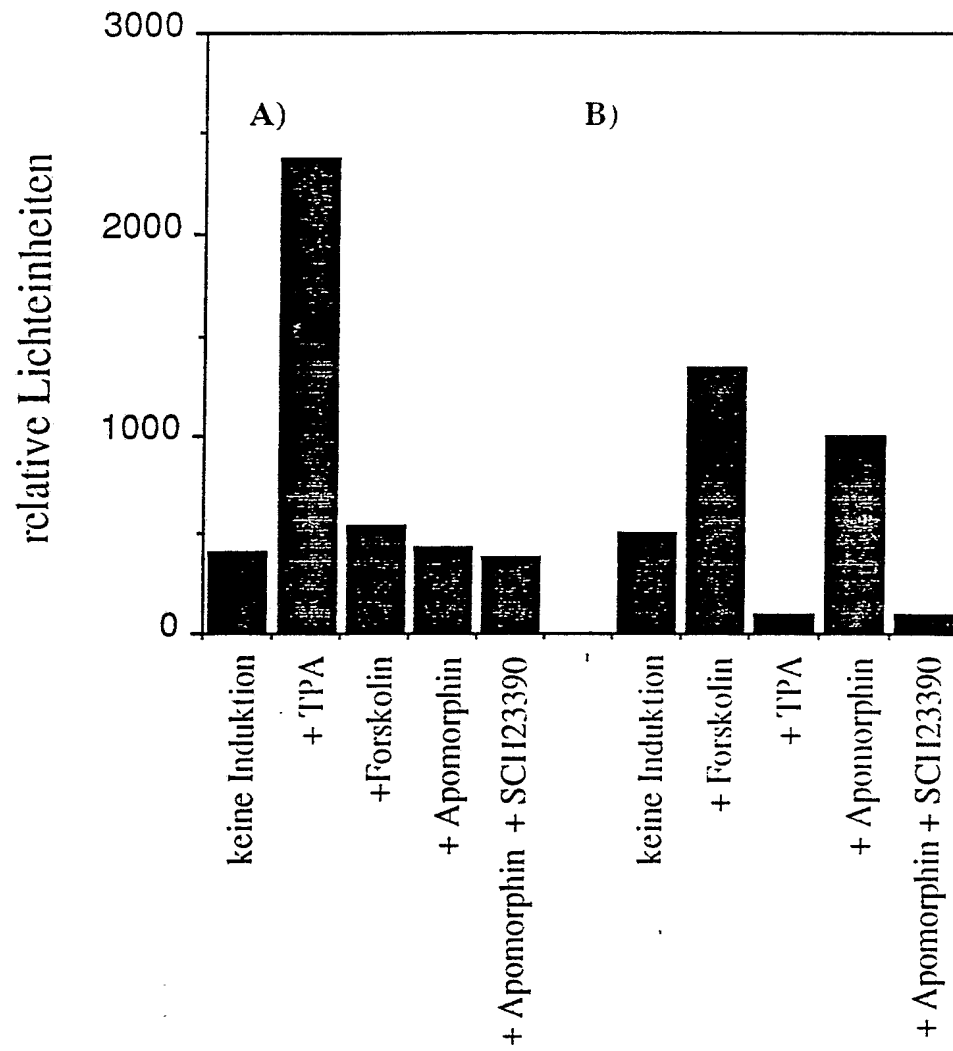
27/48

Fig. 25



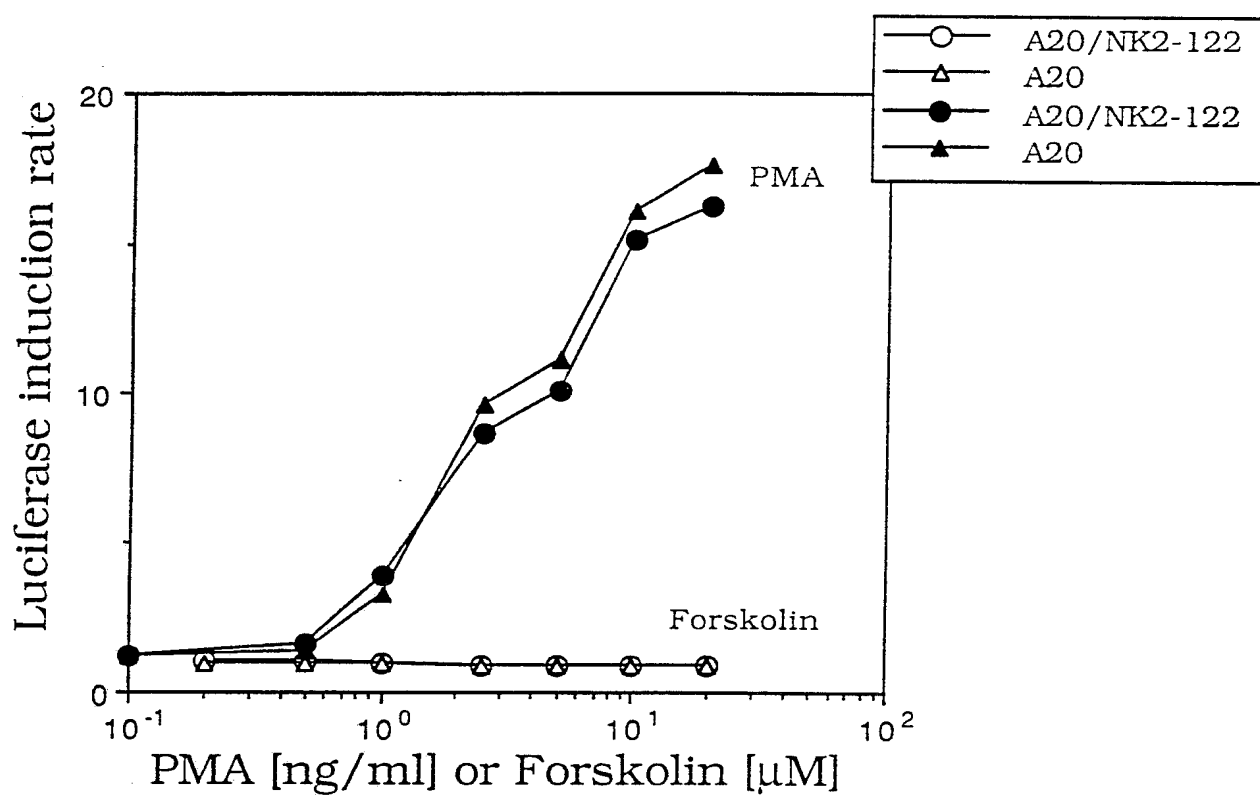
28/48

Fig. 26



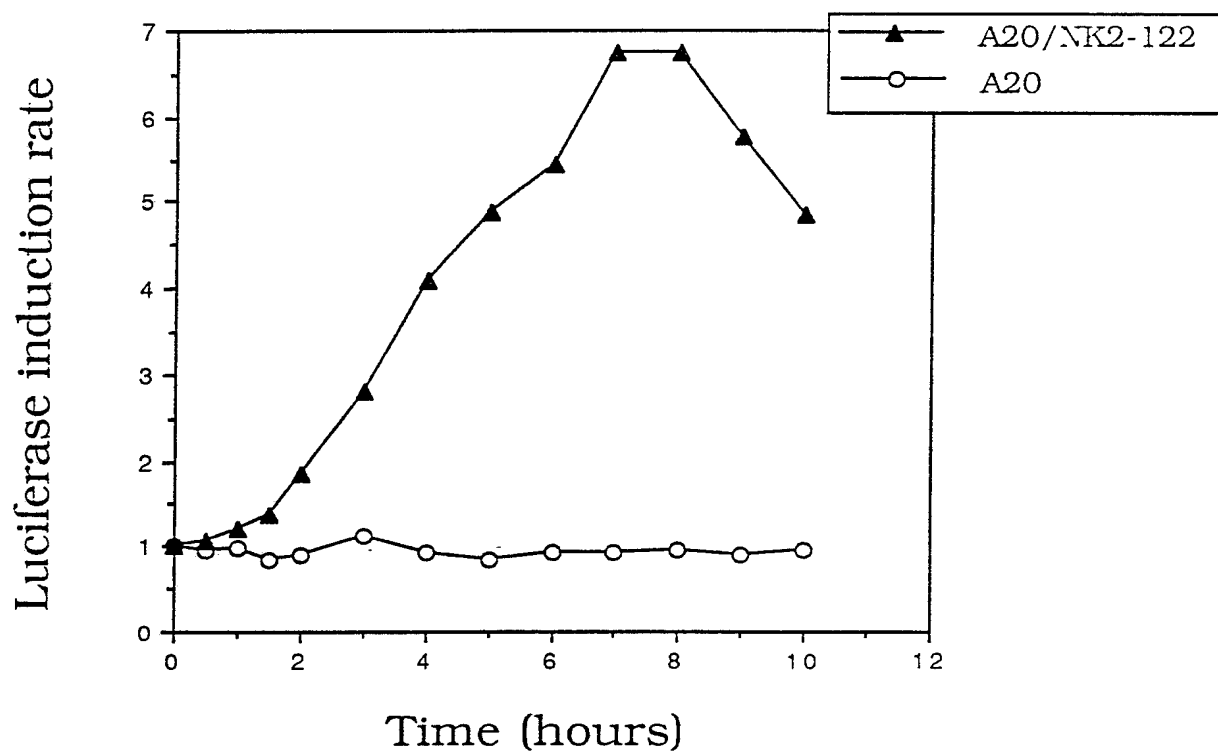
29/48

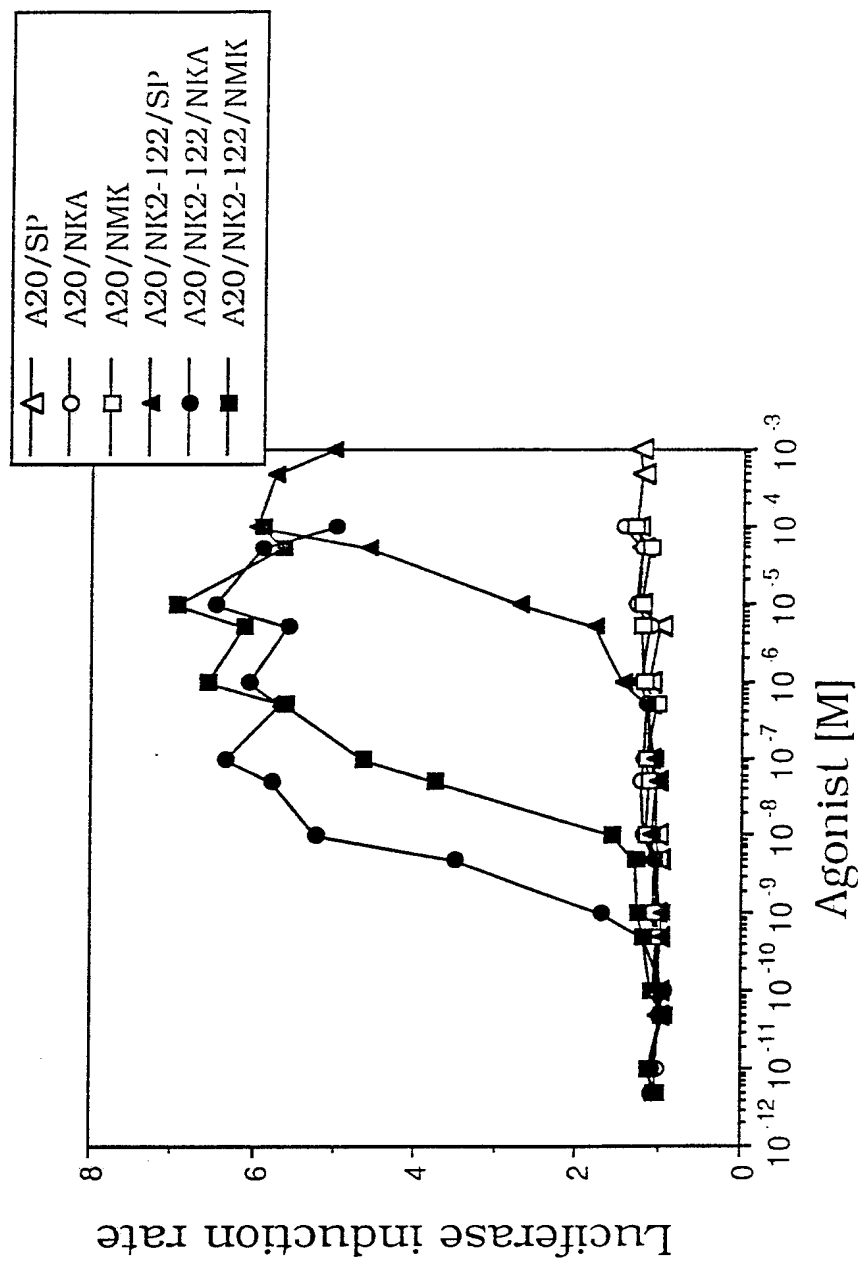
Fig. 27



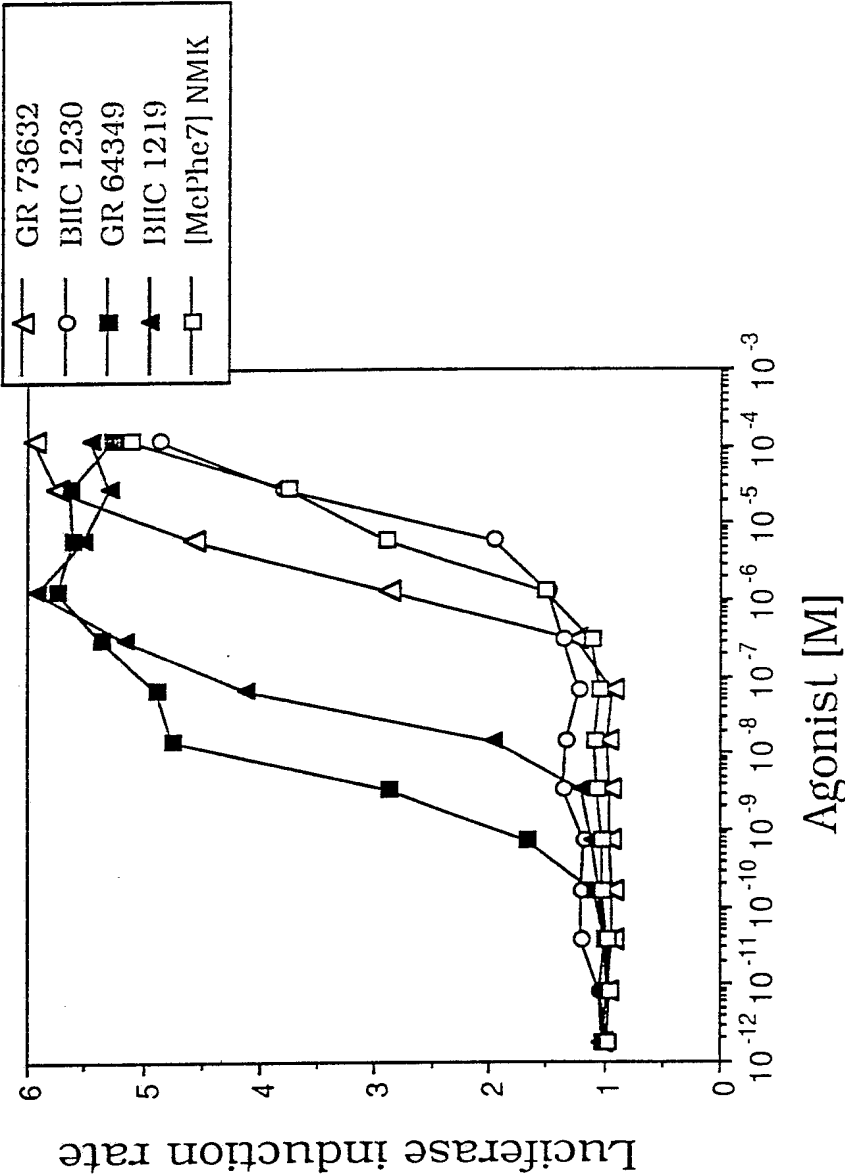
30/48

Fig. 28



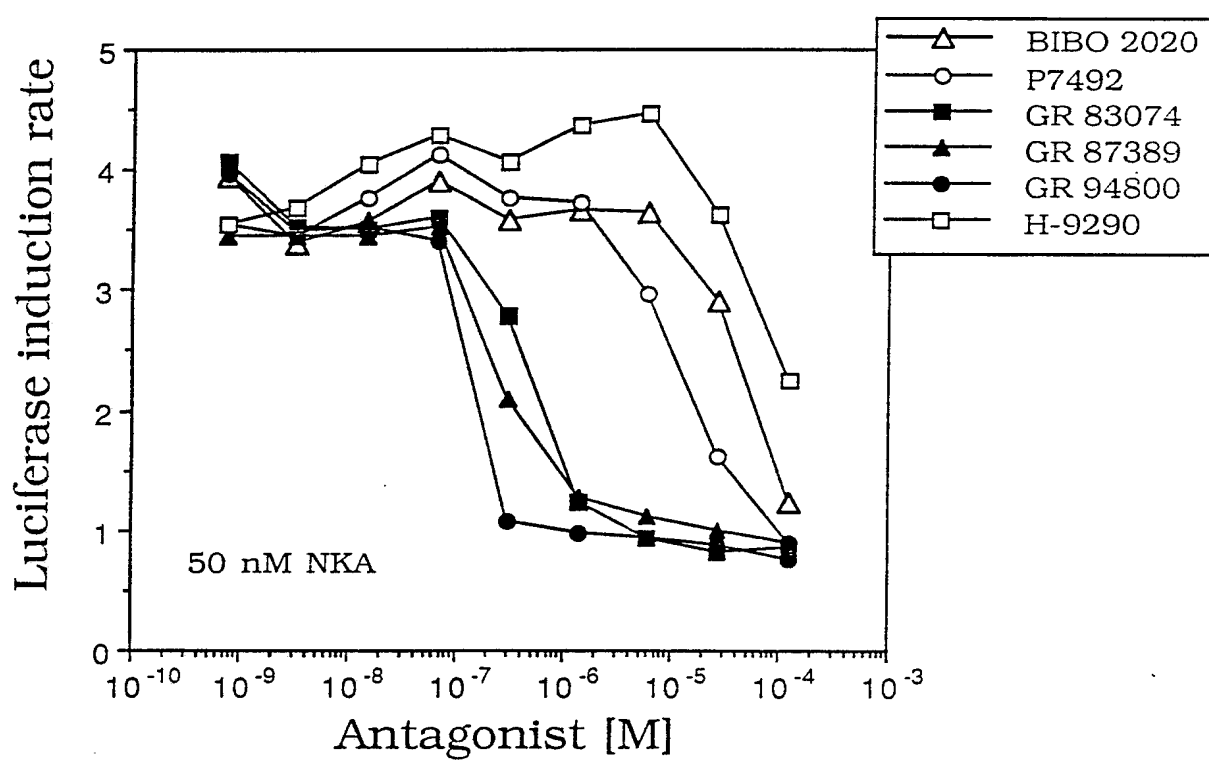
31/48  
Fig. 29A

32/48  
Fig. 29B



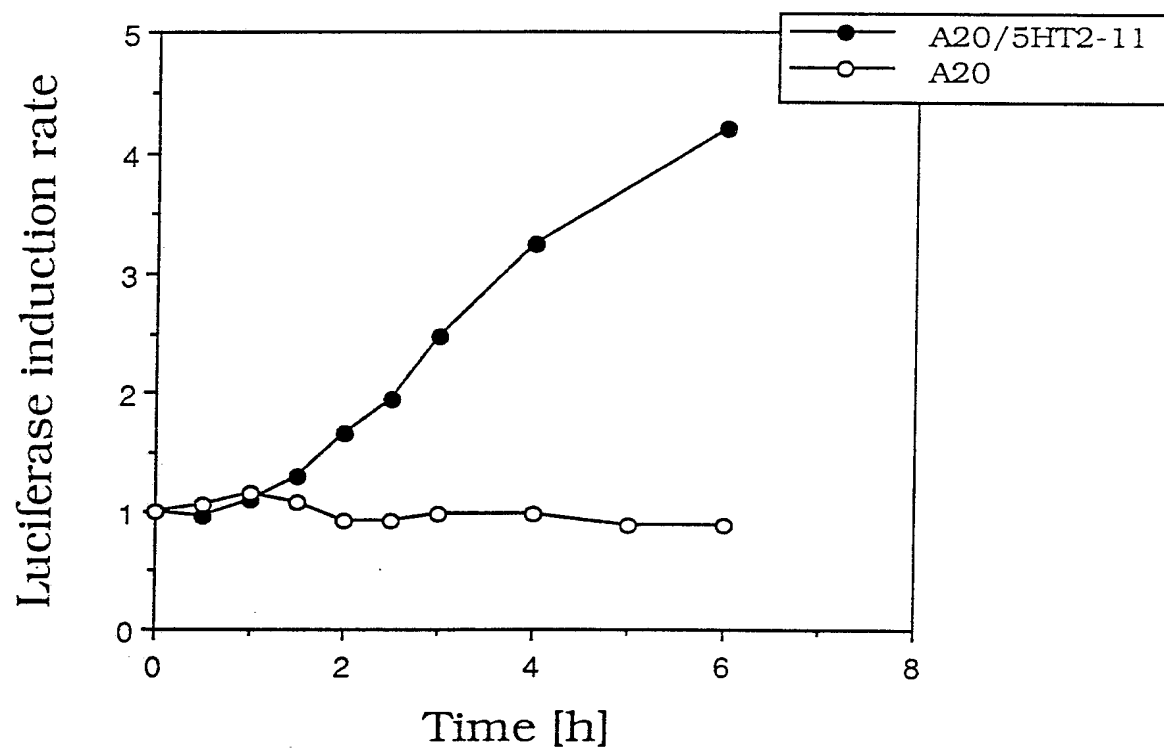
33/48

Fig. 30



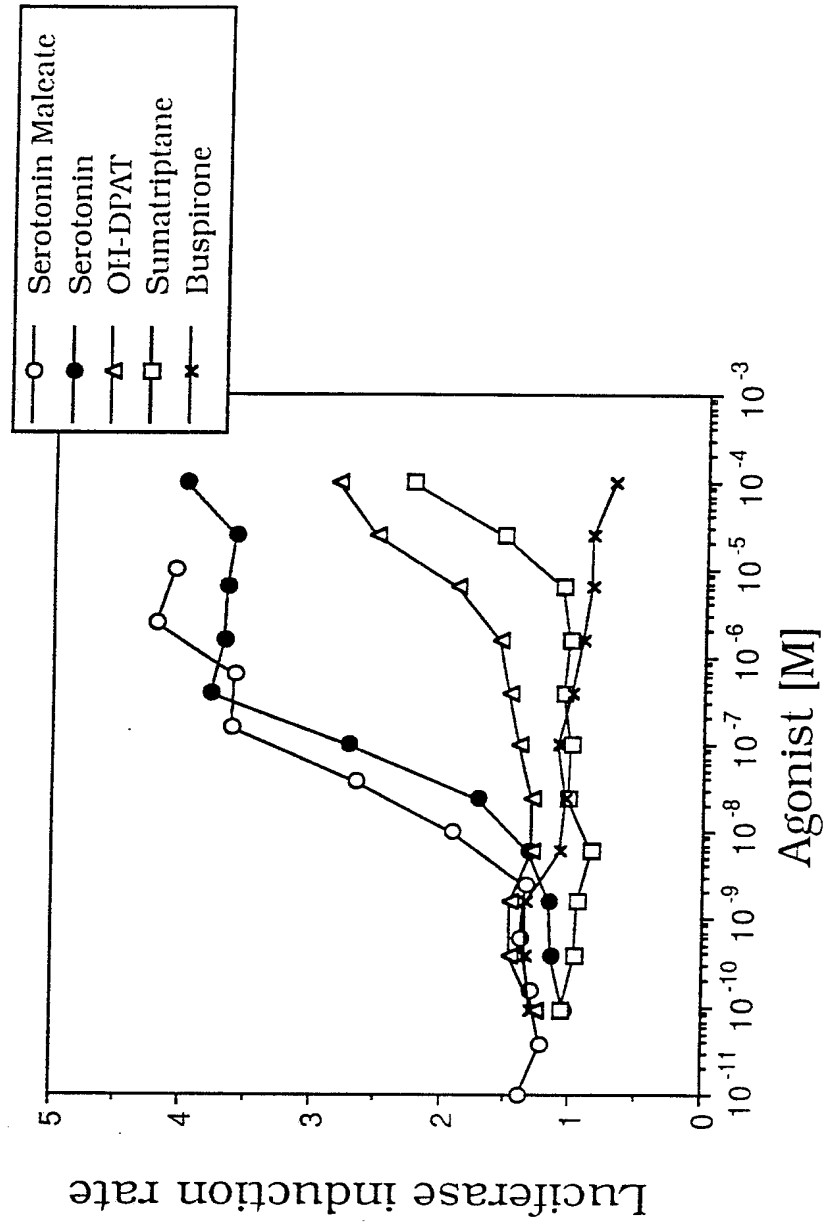
34/48

Fig. 31



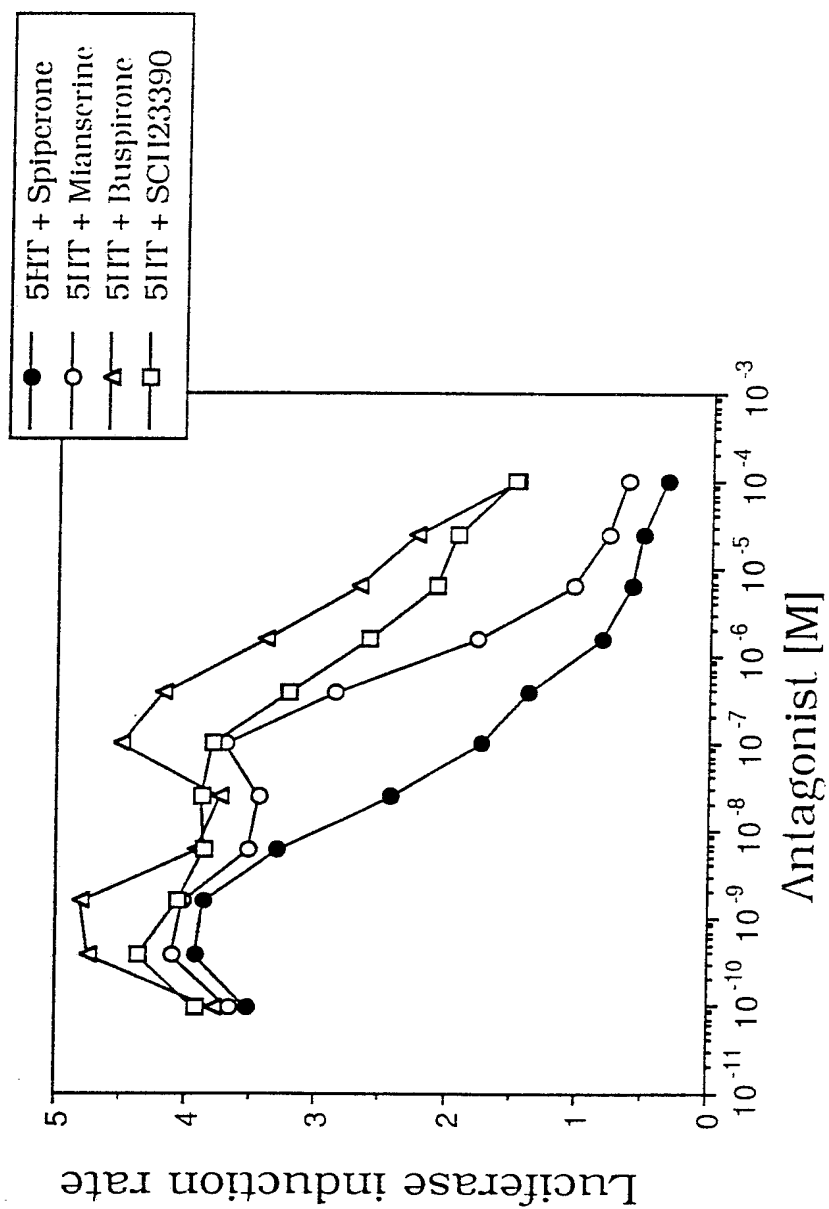
35/48

Fig. 32A



36/48

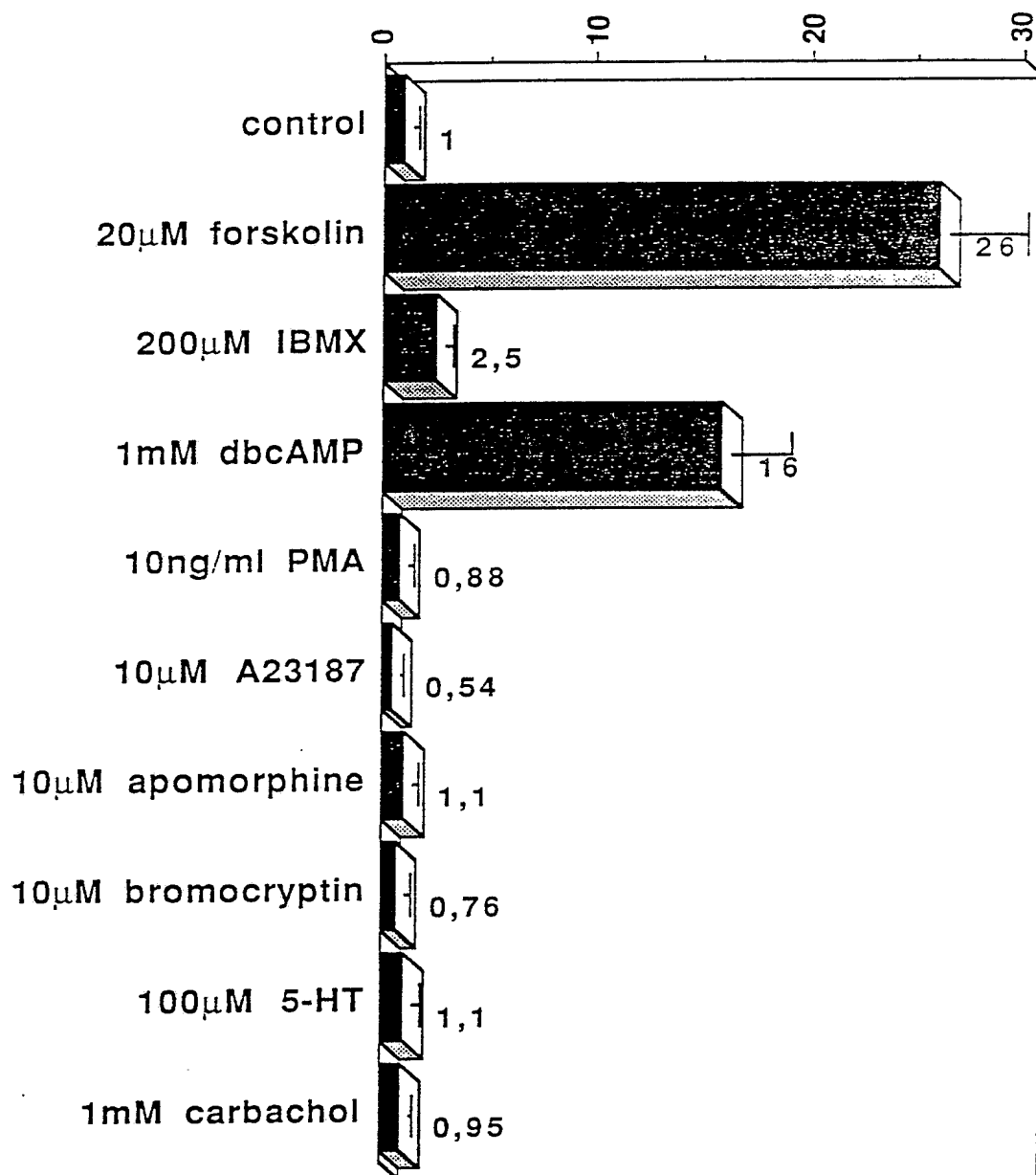
Fig. 32B

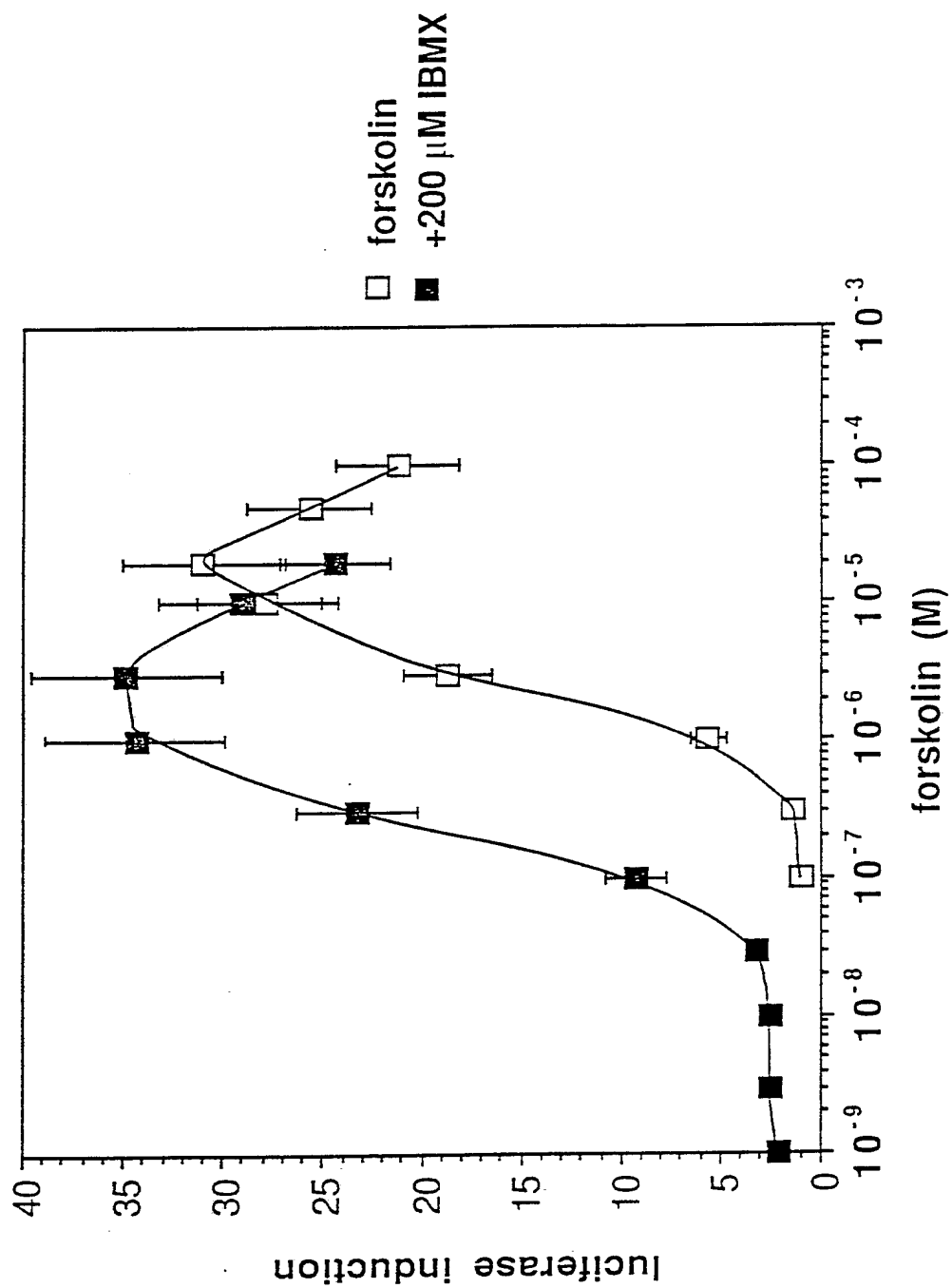


37/48

Fig. 33

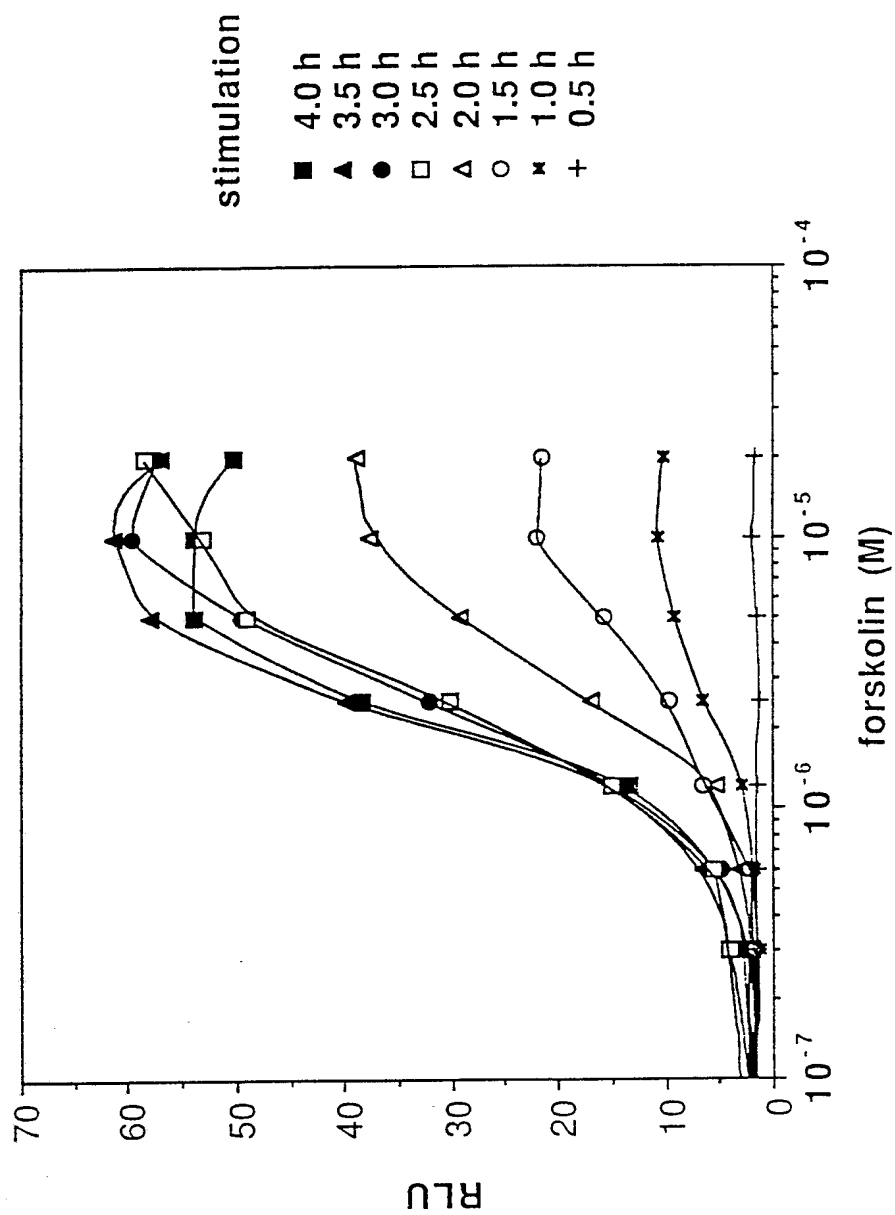
## luciferase induction

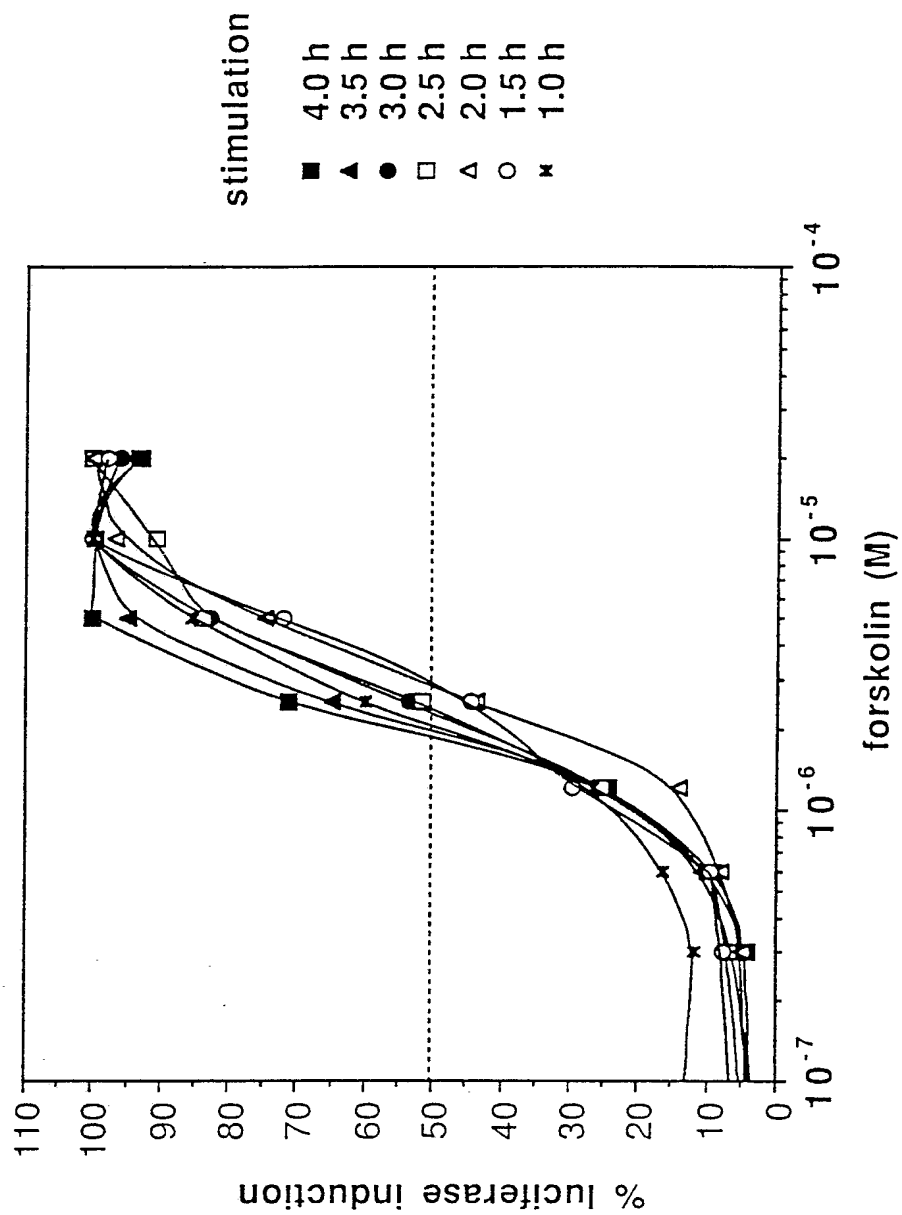


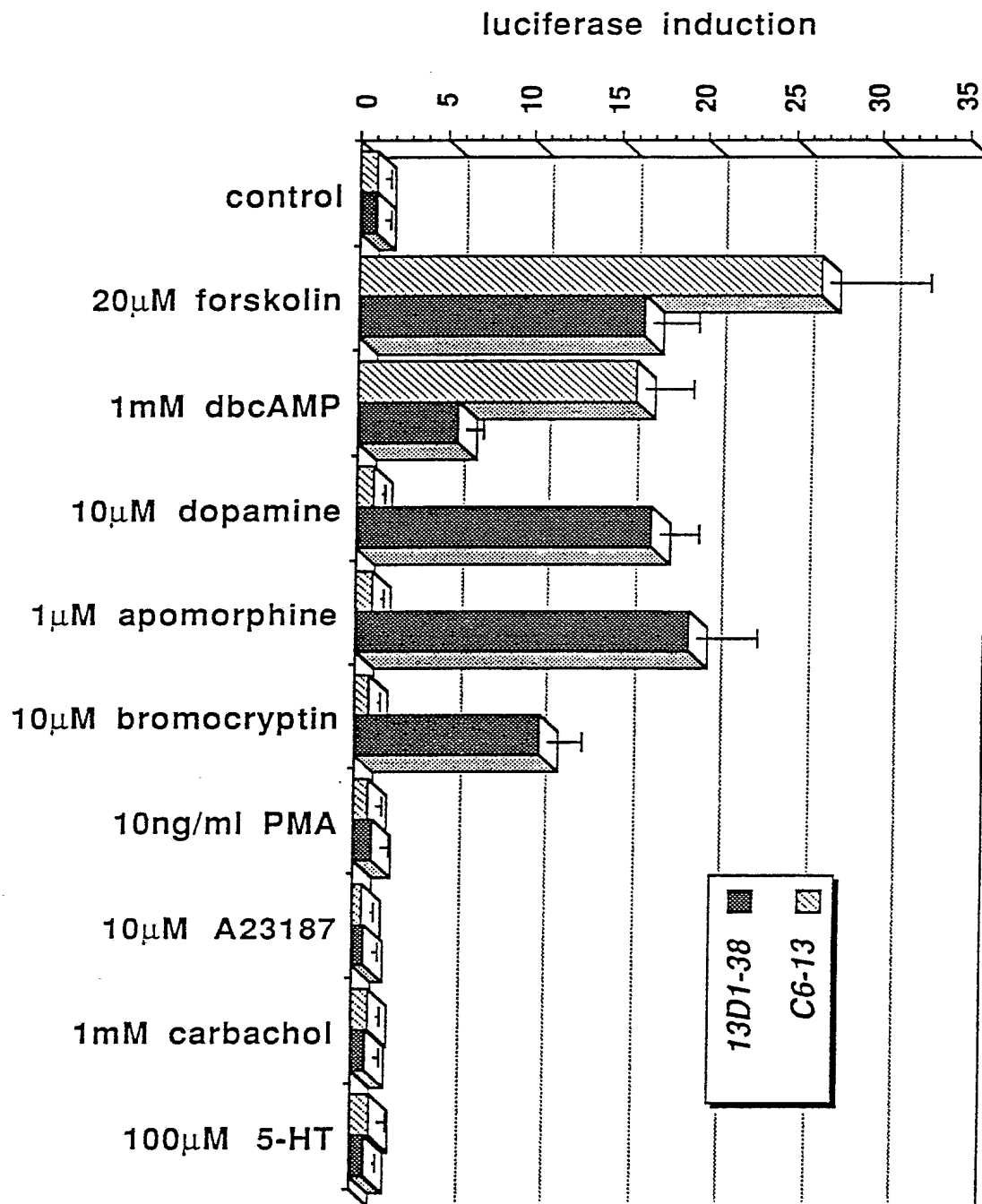
38/48  
Fig. 34

39/48

Fig. 35A

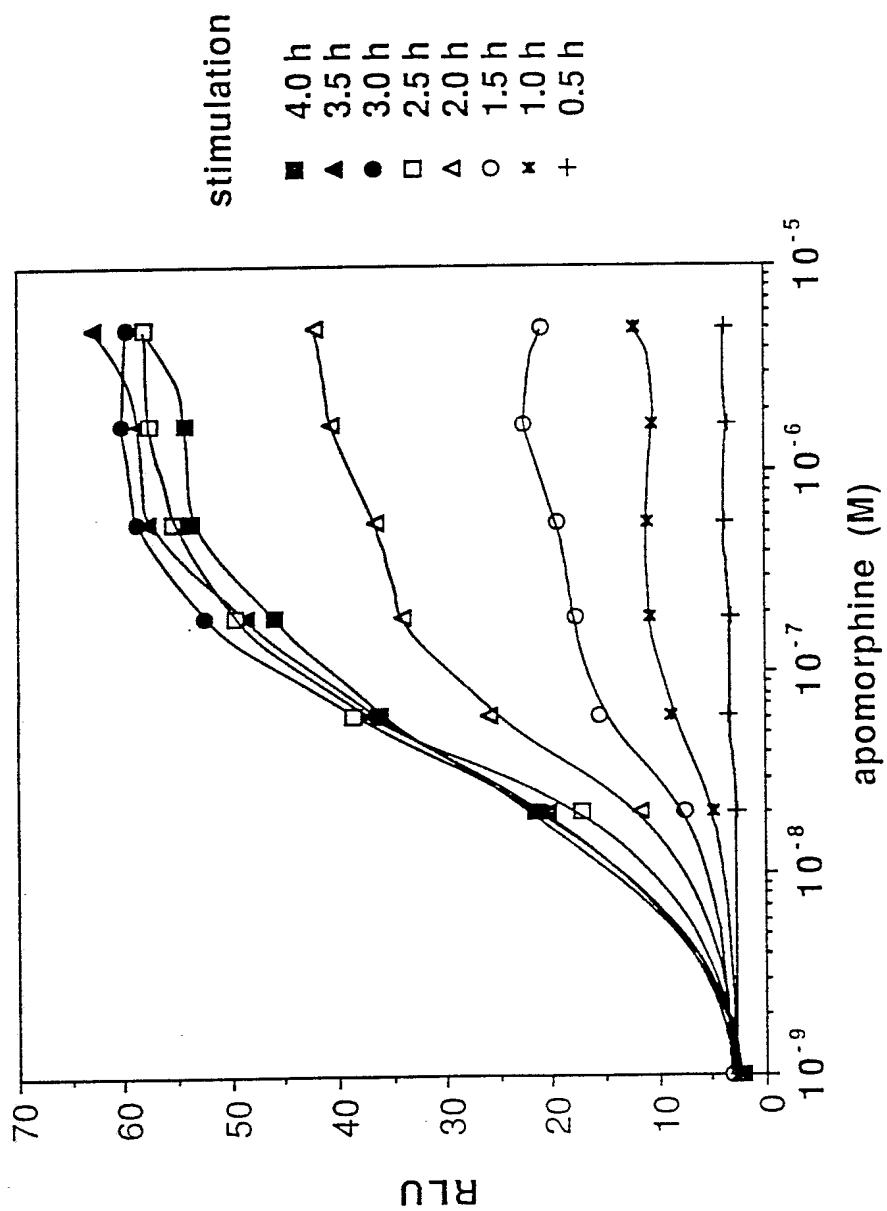


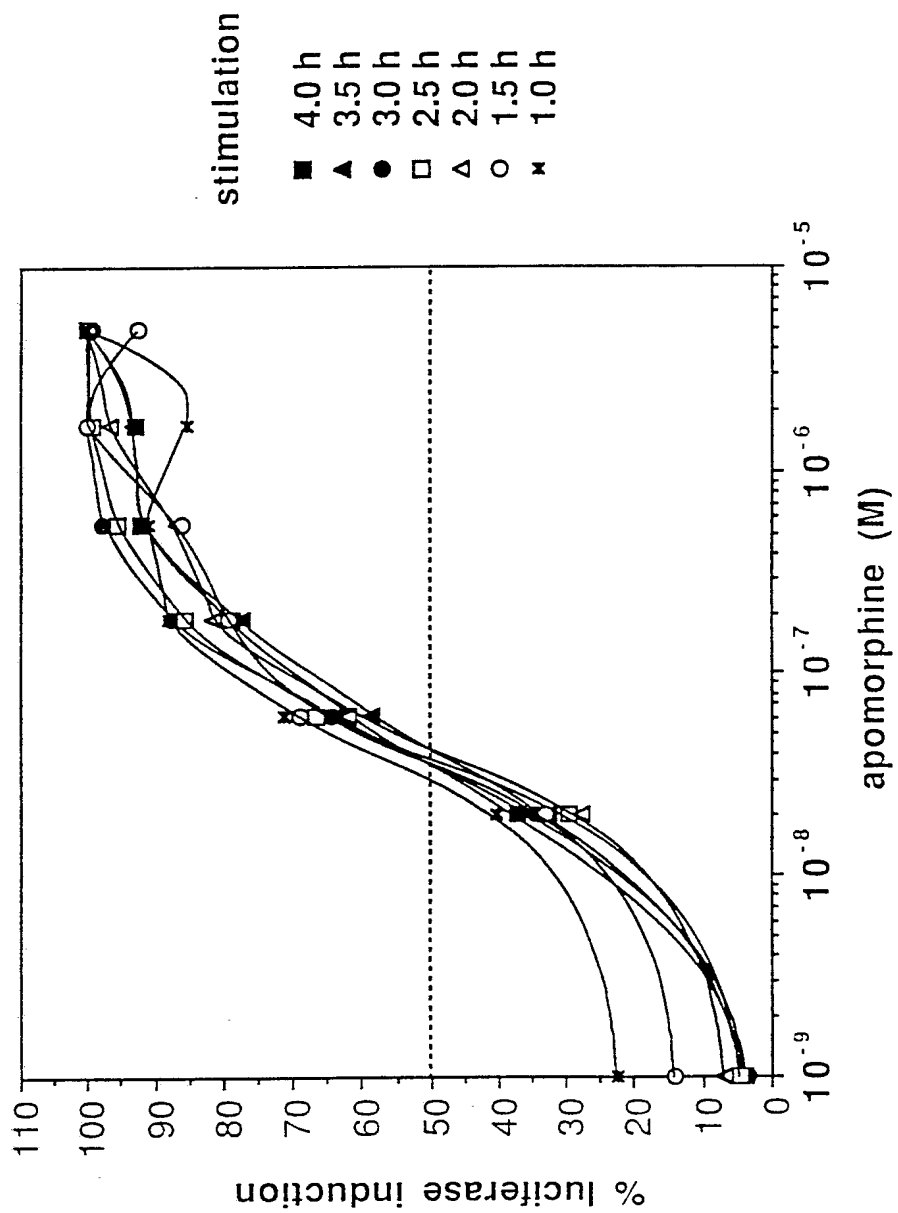
40/48  
Fig. 35B

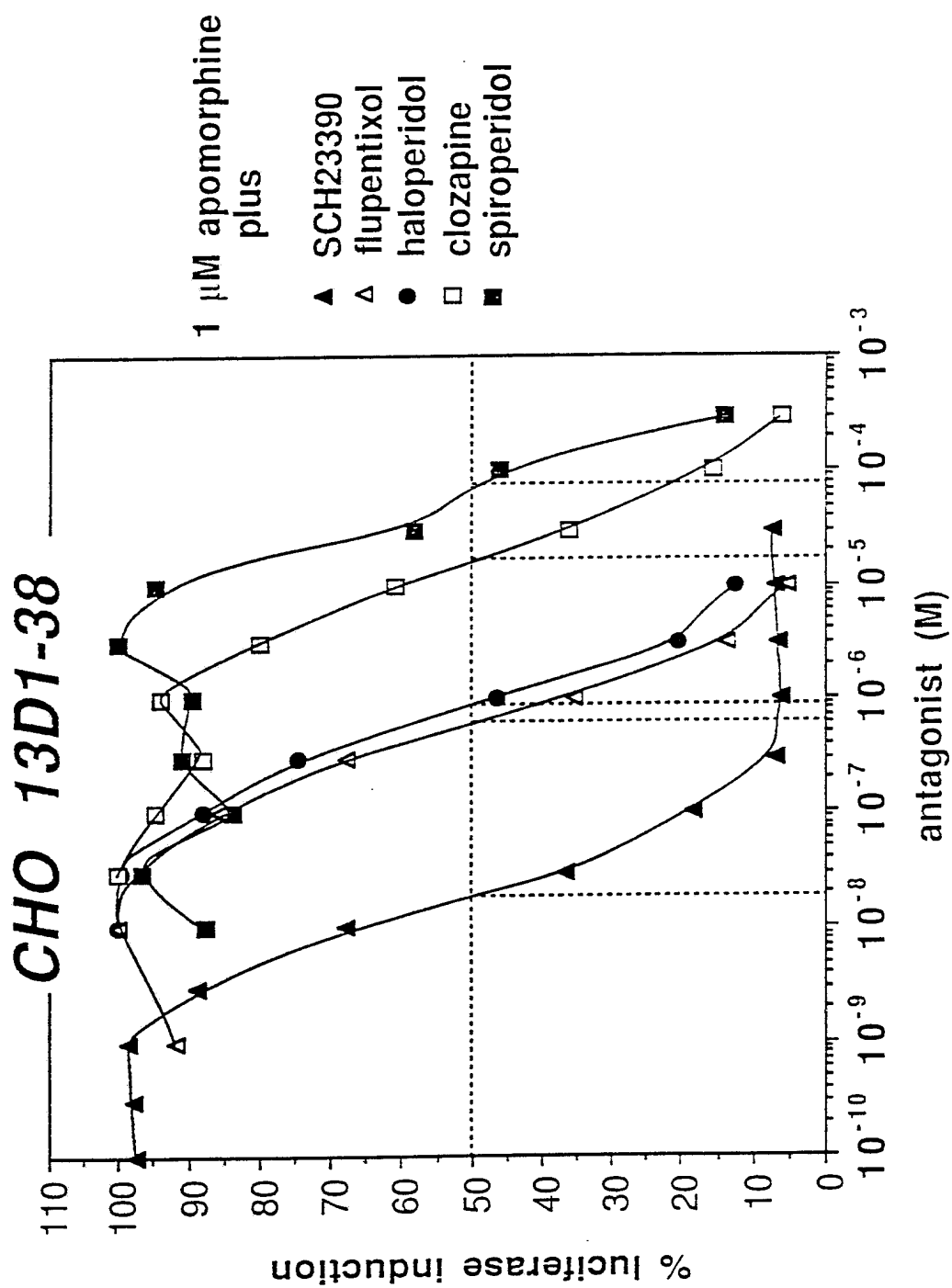
41/48  
Fig. 36

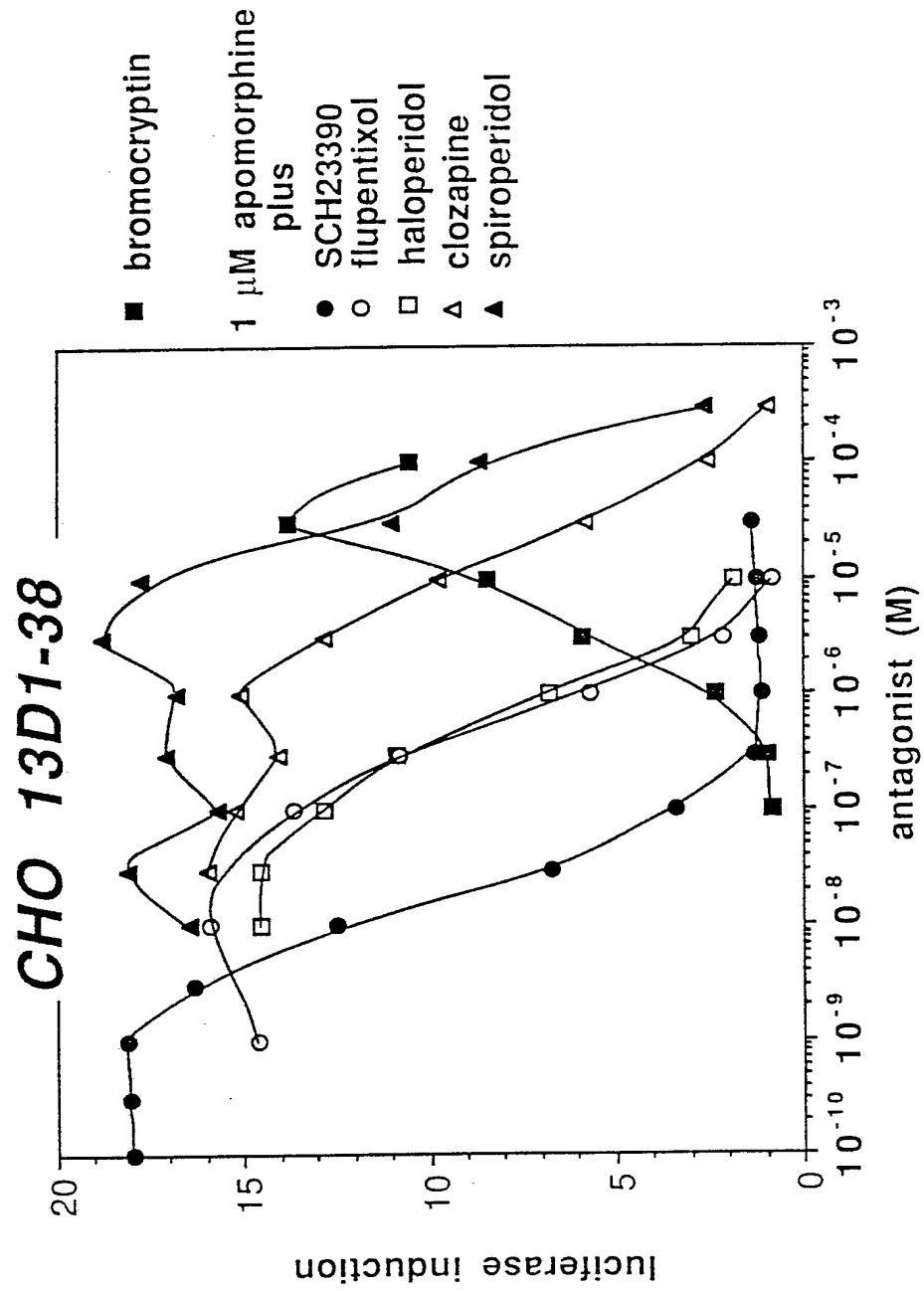
42/48

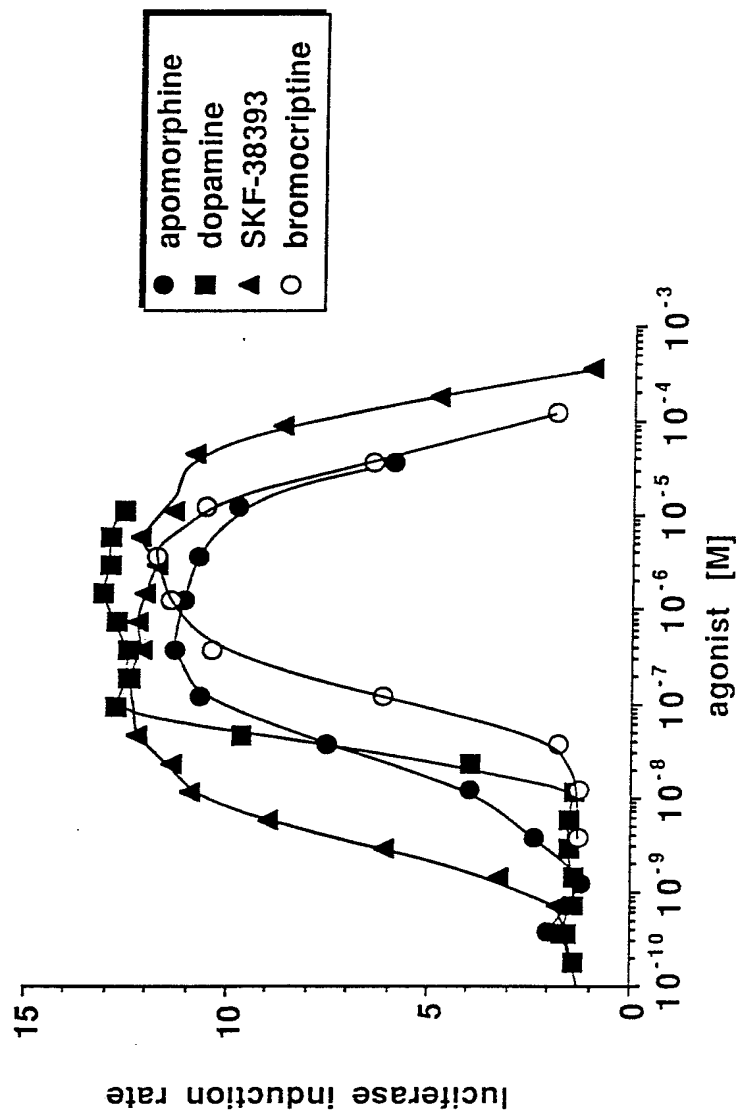
Fig. 37A

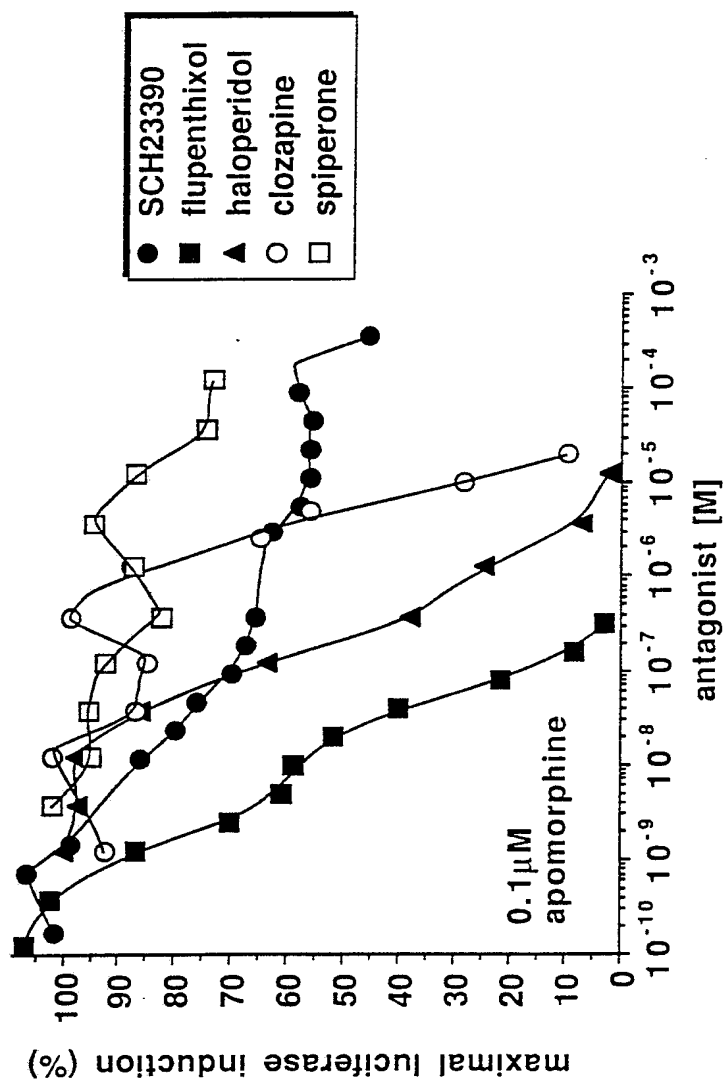


43/48  
Fig. 37B

44/48  
Fig. 38A

45/46  
Fig. 38B

46/48  
Fig. 39A*CHO 32D5-39 (Dopamine D5 receptor)*

47/48  
Fig. 39B*CHO 32D5-39 (Dopamine D5 receptor)*

48/48  
Fig. 40

